

Etude toxicologique transfrontalière
destinée à évaluer le risque encouru lors
de la consommation d'aliments gras ionisés

Toxikologische Untersuchung zur Risikobewertung
beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen
Lebensmitteln

Eine französisch-deutsche
Studie im Grenzraum Oberrhein

Rapport final / Schlussbericht INTERREG II
Projet / Projekt No 3.171

Dominique BURNOUF, Henry DELINCÉE, Andrea HARTWIG,
Eric MARCHIONI, Michel MIESCH, Francis RAUL, Dalal WERNER

Edited by Eric Marchioni ⁽¹⁾ and Henry Delincée⁽²⁾

⁽¹⁾ Faculty of Pharmacy, University Louis Pasteur, Strasbourg

⁽²⁾ Institute of Nutritional Physiology, Federal Research Centre for Nutrition,
Karlsruhe



Copyright: BFE 2002

Preface

This report is the full scientific part of the final INTERREG II project report No. 3.171, which has been submitted to the funding authorities (Région Alsace, Regierungspräsidium Freiburg) in October 2001.

This project has been co-funded from October 15, 1999 to October 15, 2001 by the EU Interregio Program in order to evaluate the toxicological properties of 2-alkylcyclobutanones which arise from radiation-induced scission of triglycerides in irradiated fat-containing foods.

Due to the great interest in this topic related to the wholesomeness of irradiated food, it was decided to publish the full scientific report (with minor revisions) to make the achieved results available for interested parties. The EU Scientific Committee on Food already made a statement (expressed on 3 July, 2002) on the final INTERREG project report, and it is appropriate not to keep the outcome of this research confidential.

It should be emphasized that the working spirit and harmony between the participants of this project has been exceptional. Only for this reason could so much research work be realized in such a short time. The working group hopes that their obtained results will be an impetus for further investigations to clarify the implications of the formation of 2-alkylcyclobutanones in irradiated food.

Contents

English summary and conclusions	5
Full scientific report (French)	7
Full scientific report (German)	105

Toxicological study to assess the risk associated with the consumption of irradiated fat-containing food

Food irradiation is considered as a highly effective processing technology to improve and maintain food safety. Indeed this process applied on food products dramatically reduces the populations of pathogens, which are annually responsible for millions of food-borne illnesses worldwide. The World Health Organization and many state agencies around the world have endorsed food irradiation as a major contributor to public health preservation. Irradiation of fat-containing food generates a family of molecules, namely 2-alkylcyclobutanones (2-ACB), that result from the radiation-induced breakage of triglycerides. These components present the same number of carbons (n) as their fatty acids precursors, and an alkyl chain of (n-4) carbons, branched in ring position 2. Until now, these molecules have been found exclusively in irradiated fat-containing food, and are thus considered as unique markers for food irradiation. Since the 2-ACB are radiation-specific components and not inherent to food, an assessment of their potential health hazard is advisable.

This study has been undertaken in order to evaluate the toxicological properties, if any, of these 2-ACB. Within the framework of INTERREG II, an EU Interregio program, a French-German research collaborative group was constituted and obtained a significant number of results.

Firstly, the synthesis of the major 2-ACB found in food has successfully been carried out. Two reaction pathways for the synthesis of saturated and mono-unsaturated 2-ACB have been established. The following compounds were synthesized: the saturated 2-decyl-cyclobutanone (2-DCB), 2-undecyl-cyclobutanone (2-uDCB), 2-dodecyl-cyclobutanone (2-dDCB), 2-tetradecyl-cyclobutanone (2-tDCB) and the mono-unsaturated 2-(undec-5'-enyl)-cyclobutanone (2-uDeCB), 2-(dodec-5'-enyl)-cyclobutanone (2-dDeCB) and 2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanone (2-tDeCB). In addition, a possible oxidation product of 2-tDCB, namely γ -stearolactone, was synthesized. The compounds thus synthesized were highly pure (> 97 %) and their chromatographic and spectral characteristics were well documented. The 2 isomeric *cis* and *trans* forms of the mono-unsaturated 2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanone (2-tDeCB, derived from oleic acid) could be isolated sufficiently pure, allowing their respective toxicological properties to be studied.

Quantification of a number of 2-ACB in various types of irradiated foods, i.e. milk powder, hazelnuts, chicken, beef, goose liver pie, cocoa, hamburger, smoked salmon, frog legs, chicken quenelles, salmon, avocado, liquid whole egg, made it possible to clearly highlight the linear relationship between the concentration of these compounds and the value of the absorbed dose by the food, even for food irradiated at very high doses. These results also showed that the length of the alkyl chain and the yield of the radiation-induced 2-ACB depend on the precursor fatty acid profile present in the irradiated food.

Finally, it was shown that 2-ACB have cyto- and genotoxic properties under precise experimental conditions. Employing human colon tumor cell lines HT 29 and HT 29 clone 19A as a model in *in vitro* experiments, neither cytotoxic nor genotoxic effects (the latter as measured with the Comet Assay) were induced by the various 2-ACB investigated (2-tDCB, 2-dDCB, 2-tDeCB (*cis* / *trans*-mix), *cis*-2-tDeCB, *trans*-2-tDeCB, γ -stearo-lactone) at short incubation times (30 minutes at 37°C). After prolonged incubation times (1 and 2 days) at higher concentrations ($\geq 50 \mu\text{M}$) cytotoxicity did, however, appear. Further studies applying other conditions or other endpoints are needed. Using another *in vitro* approach, cytotoxicity and induction of oxidative DNA damage has been investigated in two human cell lines, namely HeLa

cells frequently applied for DNA repair studies and HT 29 human colon tumor cells. As sensitive indicator of oxidative DNA damage, the frequencies of DNA strand breaks and of oxidative DNA base modifications have been quantified. The results obtained so far demonstrated that all compounds investigated (2-tDCB, 2-tDeCB, 2-d-DCB, 2-DCB) are cytotoxic in both cell lines, starting at concentrations of 100 μ M. Also, the induction of oxidative DNA damage was shown for all 2-ACB. However, for 2-tDCB and 2-tDeCB derived from the saturated stearic acid or from the unsaturated oleic acid, DNA damage was only detected at cytotoxic concentrations where long term survival of the cells was strongly diminished. Nevertheless, when investigating 2-dDCB and 2-DCB derived from palmitic acid or myristic acid, oxidative DNA damage was observed already at non-cytotoxic concentrations, which may therefore be more relevant from a toxicological point of view. The same applies to the γ -stearolactone, a possible oxidation product of 2-tDCB, which especially in HT 29 but also in HeLa cells induced oxidative DNA lesions to a high extent.

In the bacteria *Salmonella typhimurium*, 2-ACB (2-tDCB, 2-dDCB, 2-DCB) exhibited clear cytotoxic effects, which were strongly modulated by the length of the aliphatic side chain: the shorter the chain, the more acute the toxicity. In our experiments, the toxic dose for 2-DCB has been determined at 4 μ M. Until now, no mutagenic activity has been revealed under our experimental conditions, using the Ames test with the *S. typhimurium* strains TA 97, TA 98 and TA 100.

Moreover, it was shown that 2-tDCB and 2-tDeCB have a promotor effect in combination with azoxymethane (AOM) for the development of tumours in an experimental colon carcinogenesis model in rats. This was revealed by the increase of colon preneoplastic lesions and the development of a higher number of colon tumours with larger size as compared to animal controls which were not exposed to 2-ACB. It should be noted that it has not been shown that the 2-ACB are carcinogenic per se. But, both the in vitro experiments and the study carried out in vivo with laboratory rats showed that a potential toxicity of 2-ACB exists. Further experiments in the feeding studies have shown, that a very small part of the 2-ACB (2-tDCB, 2-tDeCB) was stored in the adipose tissues of the rat, whereas a similar small part was excreted in the faeces. These results indicated that most of the 2-ACB is metabolically transformed (or stored in other parts of the body). It seems, therefore, very important to perform further studies about the metabolism of the 2-ACB.

We warn against misuse of the data presented here, aiming at disqualifying food irradiation. It should be recognised that our studies were all carried out only with highly pure substances (and not with irradiated food containing a large number of complex components) in cell systems and laboratory animals. We did find that purified 2-ACB exhibited toxic effects in cell cultures, bacteria and laboratory animals. We did not investigate whether 2-ACB are toxic for humans (or laboratory animals) consuming irradiated foods. Thus, at present on the basis of our results, it seems not appropriate to draw a final conclusion concerning to the risk associated with human consumption of irradiated fat-containing foods.

However, since our results point towards toxic, genotoxic and even tumor promoting activity of certain 2-ACB, we strongly recommend to carry out further research, including confirmation of our results by other laboratories, to elucidate a possible risk associated with the consumption of irradiated fat-containing foods. Unfortunately, this potential risk cannot be estimated at present, because of the lack of studies in different fields of investigation. To characterize the potential risk, hazards need to be identified, the exposure, the exact dose-response and particularly the kinetics and metabolism of 2-ACB in the living organism should be elucidated. All these studies are deemed necessary to gain insight into the mechanisms of the toxic effects. Numerous questions still remain to be answered, and much research is left to be done, before a qualified risk assessment can be performed. However, a beginning is made, and we hope to be able to give some answers in the near future.

RAPPORT SCIENTIFIQUE EN LANGUE FRANÇAISE

Sommaire

Liste des partenaires.....	9
Abréviations.....	10
RAPPORT SCIENTIFIQUE	
1. Etat de l'art et description du projet.....	11
2. Résultats et discussion.....	14
2.1. Synthèse et caractérisation des composés étudiés.....	14
2.2. Séparation des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> de la 2-tétradécénylcyclobutanone.....	26
2.3. Fourniture de composés marqués.....	30
2.4. Fourniture des composés synthétisés.....	30
2.5. Détermination de la teneur en 2-alkylcyclobutanones dans les aliments ionisés.....	41
2.6. Etudes toxicologiques.....	57
2.6.1. Cytotoxicité et génotoxicité des 2-alkylcyclobutanones vis à vis des lignées de cellules tumorales humaines (HT 29 et HT 29 cl 19 A).....	57
2.6.2. Lésions oxydatives de l'ADN produites par les 2-alkylcyclobutanones dans différentes cultures de cellules.....	73
2.6.3. Etude des effets toxicologiques induits par les 2-alkylcyclobutanones chez la bactérie.....	81
2.6.4. Incidence de la 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB) et de la 2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB) sur la cancérogenèse intestinale chez le rat.....	90
2.7. Détection des 2-alkylcyclobutanones dans les matières grasses et fécales des animaux nourris avec ces composés.....	96
2.8. Conclusion.....	103

LISTE DES PARTENAIRES

Université Louis Pasteur de Strasbourg-CNRS

Eric Marchioni

Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment -UMR 7512
74, route du Rhin F-67400 Illkirch

Tel :00.33.(0)3.90.24.43.26 Fax :00.33.(0)3.88.66.01.90

Courriel : eric.marchioni@pharma.u-strasbg.fr

Université Louis Pasteur de Strasbourg-INSERM

Françis Raul

Laboratoire du Contrôle Métabolique et Nutritionnel en Oncologie Digestive (IRCAD)
1, Place de l'hôpital, F-67000 Strasbourg.

Tel : 00.33.(0)3.88.11.90.23

Courriel : Francis.Raul@ircad.u-strasbg.fr

Université Louis Pasteur de Strasbourg-CNRS

Michel Miesch

Faculté de Chimie, Laboratoire de Chimie Organique Synthétique - UMR 7123
1, rue Blaise Pascal BP 296/R8 F-67008 Strasbourg Cedex

Tel/ Fax :00.33.(0)3.90. 24 17 52

Courriel : miesch@chimie.u-strasbg.fr

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

Dominique Burnouf

Groupe d'Epidémiologie Moléculaire du Cancer (IRCAD) - UPR 9003
1, Place de l'hôpital, F-67000 Strasbourg

Tel : 00.33.(0)3.88.11.90.31 FAX : 00.33.(0)3.88.11.90.99

Courriel : Dominique.Burnouf@ircad.u-strasbg.fr

Universität de Karlsruhe

Andrea Hartwig

Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie
Kaiserstrasse, 12, Postfach 6980 D-76128 Karlsruhe

Tel : 0049(0)721- 608-2936 FAX : 0049(0)721 - 608-7254

Courriel : Andrea.Hartwig@chemie.uni-karlsruhe.de

Bundesforschungsanstalt für Ernährung

Henry Delincée

Haid-und-Neu-Str. 9, D-76131 Karlsruhe

Tel : 0049(0)721-6625-405 FAX : 0049(0)721-6625-404

Courriel : henry.delincee@bfe.uni-karlsruhe.de

Aérial

Dalal Aoudé Werner

19, rue de Saint Junien, F-67300 Schiltigheim

Tel : 00.(0)3.88.19.15.21 FAX : 00.(0)3.88.19.15.23

Courriel : da.werner@aerial-crt.com

ABRÉVIATIONS

2-alkylcyclobutanones

2-HCB	2-hexylcyclobutanone
2-OCB	2-octylcyclobutanone
2-DCB	2-décylcyclobutanone
2-uDeCB	2-(undéc-5'-ényl)-cyclobutanone
2-uDCB	2-undécylcyclobutanone
2-dDeCB	2-(dodéc-5'-ényl)-cyclobutanone
2-dDCB	2-dodécylcyclobutanone
2-tDeCB	2-(tétradéc-5'-ényl)-cyclobutanone
2-tDCB	2-tétradécylcyclobutanone

Hydrocarbures volatils

C _{16:2}	1,7-hexadécadiène
-------------------	-------------------

Unités

% m/m	pourcentage exprimé en masse
% m/v	pourcentage exprimé en masse/volume
% v/v	pourcentage exprimé en volume

Divers

¹³⁷ Cs	isotope de césium 137
⁶⁰ Co	isotope de cobalt 60
Abs	absent
BCR	Bureau Communautaire de Référence (Bruxelles)
CEN	Comité Européen de Normalisation
CHCH	2-cyclohexyl-cyclohexanone
CPG/FID	chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme
CPG/SM	chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse
EDTA	acide éthylènediamine tétracétique
EN X	norme européenne numéro X
FAO	Organisation des Nations-Unies pour l'Alimentation (Rome)
IAEA	Agence Internationale pour l'Energie Atomique (Vienne)
MTT	bromure de [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium]
PBS	solution saline de tampon phosphate
PFHA	O-(2,3,4,5,6) pentafluorobenzylhydroxylamine
RPE	résonance paramagnétique électronique
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SPE	extraction en phase solide
SPI	injecteur à température programmable équipé d'un septum
TBME	oxyde de méthyle et <i>tert</i> -butyle
TRIS	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane
URP	unique radiolytic product
VVSM	viande de volaille séparée mécaniquement
WHO	Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Genève)
WST-1	disulfonate de 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène

RAPPORT SCIENTIFIQUE

1. ETAT DE L'ART ET DESCRIPTION DU PROJET

Les travaux de recherche sur les méthodes de détection des traitements ionisants des aliments, menés de façon programmée depuis 10 ans au niveau européen, ont permis d'aboutir récemment à la rédaction de cinq méthodes officielles normalisées à l'échelle européenne (C.E.N. TC 275/WG 8). Une de ces méthodes consiste à extraire, purifier et doser par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) une famille de molécules, les 2-alkylcyclobutanones, radio-induites à partir des triglycérides présents dans les aliments (Figure N°1).

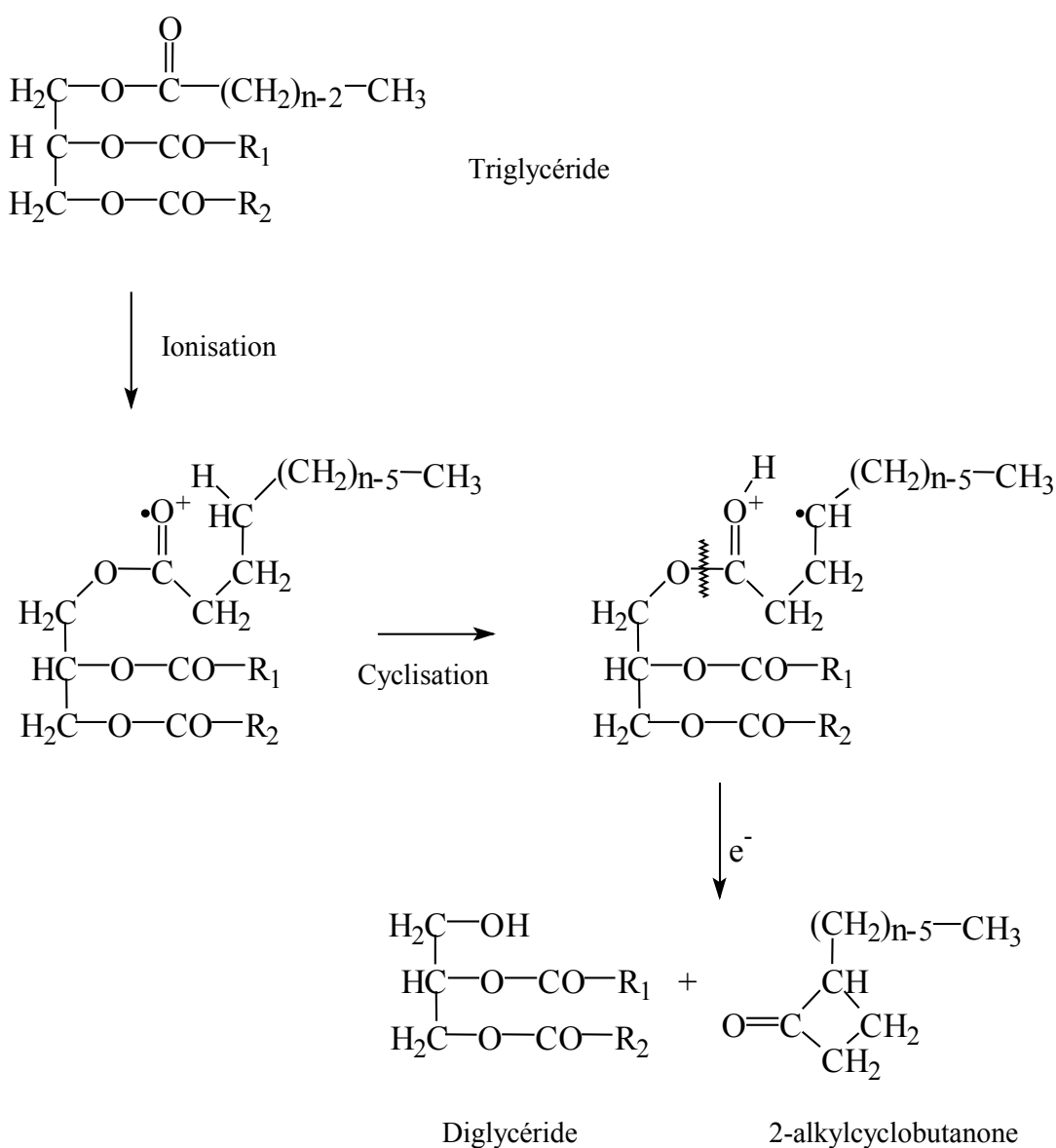


Figure N°1 : Mécanisme de formation des 2-alkylcyclobutanones.

Une particularité intéressante de ces molécules réside dans le fait qu'elles n'ont jamais été retrouvées dans des aliments autres que ceux soumis à l'action de rayonnements ionisants. Ces molécules sont donc considérées, jusqu'à preuve du contraire, comme des "Unique Radiolytic Products" (URP).

Les traitements ionisants font partie des nouvelles méthodes d'assainissement des aliments. Ils trouvent leur principale application dans la suppression de la flore pathogène et des parasites (responsables des intoxications alimentaires) et dans la diminution de la flore totale d'altération et des insectes présents dans les aliments (responsables de la dégradation des aliments). Il s'agit là d'une méthode de choix pour la conservation et l'hygiénisation des aliments. Ils sont appliqués dans de nombreux pays, au traitement d'une grande diversité d'aliments qui seront directement commercialisés ou utilisés en tant qu'ingrédients dans l'industrie agro-alimentaire. Plus particulièrement, dans le cas des ingrédients (épices et aromates), l'ionisation se présente comme une élégante alternative à d'autres traitements qui présentent de réels risques pour la santé humaine (par exemple, la fumigation à l'oxyde d'éthylène qui présente des risques cancérogènes reconnus). De ce fait, les consommateurs sont exposés à cette famille de 2-alkylcyclobutanones par ingestion d'aliments ou d'ingrédients présents dans l'alimentation humaine.

La recommandation 659 du Comité Mixte d'Experts (Anonym, 1981) concernant l'absence de risques toxicologiques lors de la consommation de produits traités à moins de 10 kGy par rayonnements ionisants est antérieure à la découverte des 2-alkylcyclobutanones dans les aliments (Stevenson, M.H. *et al.*, 1990; Stevenson, M.H. 1996).

L'objectif de ce travail est de voir si des composés chimiques (les 2-alkylcyclobutanones), spécifiquement induits par l'action des rayonnements ionisants sur les graisses (triglycérides) alimentaires, présentent ou non un risque toxicologique pour le consommateur lors de leur ingestion. Ce travail doit apporter des éléments d'appréciation aux membres de l'Agence Française de Sécurité Alimentaire (anciennement Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France), des Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten et Bundesministerium für Gesundheit ainsi que du Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CEE) qui ont la charge de donner un avis officiel lors de chaque nouvelle demande d'autorisation de traitement ionisant. Il devrait aussi apporter une contribution scientifique supplémentaire et originale aux divers travaux déjà effectués dans le domaine des traitements ionisants des aliments.

Ce programme de recherche vise à apporter une connaissance scientifique et technique originale, tant sur l'évaluation des expositions des individus et populations à ces nouveaux contaminants chimiques d'origine alimentaire, que sur l'évaluation des risques (mode d'action des 2-alkylcyclobutanones éventuellement toxiques ingérés à faibles doses pendant une très longue période). La quantification de ces contaminants dans les aliments sera également estimée. Le travail proposé se déroulera selon trois phases:

① la synthèse de ces composés (éventuellement radio marqués) et la vérification de leur pureté, de leurs caractéristiques spectrales et chromatographiques,

② le dosage de ces produits dans les aliments ionisés, selon la norme EN 1785 (Anonym. 1996) et enfin

③ l'étude de leur toxicité par, entre autres des tests *in vitro* par les tests de la comète, de dénaturation alcaline ou d'électrophorèse de plasmides ou encore des tests de mutagénécité et finalement des tests *in vivo* sur la cancérogénèse du gros côlon avec des rats et des souris transgéniques.

Les résultats scientifiques attendus concernent essentiellement l'identification de nouveaux contaminants alimentaires ou inversement, une démonstration de l'innocuité de ces produits. En fonction des résultats obtenus une meilleure appréciation des risques résultant de l'exposition des individus et populations à ce nouveau type de contaminant chimique dans les aliments sera disponible. En matière de retombées socio-économiques, cette étude est susceptible soit de permettre la poursuite du développement de cette méthode de traitement des aliments (en cas

d'absence de toxicité), soit d'en freiner sérieusement l'utilisation (en cas de mise en évidence d'une toxicité des 2-alkylcyclobutanones). Le risque éventuel encouru pourra être limité par une information des pouvoirs publics qui sont très concernés par l'éventuelle incidence toxicologique des traitements ionisants sur les aliments.

Cette 2^{ème} partie du rapport comporte trois sections : Synthèse des composés à étudier, leur recherche et dosage dans les aliments ionisés et les études toxicologiques des 2-ACB synthétisées.

RÉFÉRENCES

Anonym (1981), Wholesomeness of irradiated food, Report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, World Health Organization, Geneva, Technical Report Series 659.

Anonym (1996), Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones, European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

Stevenson M.H., Crone A.V.J. and Hamilton J.T.G. (1990), Irradiation detection, *Nature*, **344**, 202-203.

Stevenson M.H. (1996), Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial, In *Detection Methods for Irradiated Food - Current Status* C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray and J. Pearce, eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 269-284.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS ÉTUDIÉS

Michel Miesch

Laboratoire de Chimie Organique Synthétique (UMR 7123)

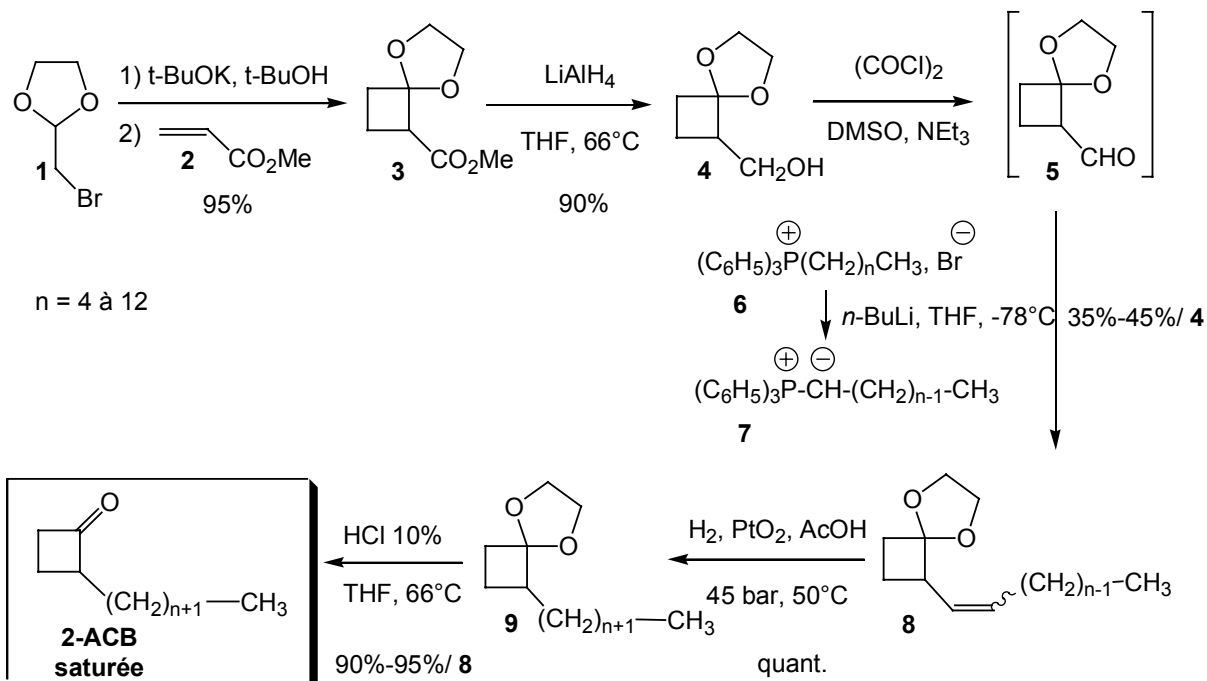
Université Louis Pasteur de Strasbourg

INTRODUCTION

Les 2-alkylcyclobutanones possédant une chaîne latérale carbonée saturée ou insaturée (2-ACB) sont des composés qui se forment lorsque les aliments contenant de la matière grasse sont soumis à un traitement ionisant. Les 2-ACB sont des URP (Unique Radiolytic Product) c'est à dire des produits formés seulement et seulement si les aliments sont soumis à un traitement ionisant. Par conséquent la détection des 2-ACB - qui peuvent donc être considérés comme de véritables marqueurs d'aliments irradiés - permettra de dire si les aliments ont ou n'ont pas subi de traitement ionisant. La détection des 2-ACB s'effectuant à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, il s'avérait nécessaire de disposer d'étalons internes à savoir les 2-ACB. C'est pourquoi, dans le cadre de ce programme, nous nous sommes intéressés à développer de nouvelles voies de synthèse permettant d'accéder de manière efficace aux 2-alkylcyclobutanones (2-ACB) étant donné que les méthodes décrites jusqu'à présent étaient peu efficaces (Boyd *et al.*, 1991, Crone *et al.*, 1993 et Hamilton *et al.*, 1996).

De plus, les quantités relativement importantes de composés nécessaires à la réalisation d'études toxicologiques ont nécessité la mise au point d'une nouvelle méthode de synthèse permettant d'accéder à ces composés de manière plus efficace et surtout plus rapide.

La première méthode que nous avons développée (Miesch *et al.*, 1999) consiste à mettre en place dès la première étape de synthèse le cycle à 4 chaînons: ceci a pu être réalisé par cycloaddition [2+2] entre le dérivé bromé **1** et l'acrylate de méthyle **2** pour donner le dérivé cyclobutanique **3** (Kirmse *et al.*, 1969). Une séquence réduction - oxydation du groupement ester conduit, *via* l'alcool **4**, à l'aldéhyde **5** (Gruseck *et al.*, 1990) composé stable uniquement à -78°C . Une réaction de Wittig permet ensuite de mettre en place la chaîne latérale en position 2 pour conduire au composé **8** ($n = 4$ à 12). Il s'avère donc extrêmement aisé de mettre en place une chaîne latérale de longueur voulue en jouant simplement sur la longueur de la chaîne carbonée des sels de phosphonium **6**, précurseurs des phosphoranes **7** intervenant au cours de la réaction de Wittig. Une hydrogénation de la double liaison des composés **8** conduit aux dioxolanes **9**, qui après déprotection en milieu acide fournit les 2-hexyl ($n = 4$), 2-heptyl ($n = 5$), 2-octyl ($n = 6$), 2-décyl ($n = 8$), 2-undécyl ($n = 9$), 2-dodécyl ($n = 10$) et 2-tétradécylcyclobutanones ($n = 12$) (Figure N°2).



$n = 4$: 2-hexylcyclobutanone; $n = 5$: 2-heptylcyclobutanone; $n = 6$: 2-octylcyclobutanone; $n = 8$: 2-décylcyclobutanone;
 $n = 9$: 2-undécylcyclobutanone; $n = 10$: 2-dodécylcyclobutanone; $n = 12$: 2-tétradécylcyclobutanone

Figure N°2: Synthèse des 2-alkylcyclobutanones à chaîne latérale saturée.

Pour les 2-alkylcyclobutanones possédant une chaîne latérale insaturée, nous avons développé un schéma réactionnel utilisant comme produit de départ l'aldéhyde **5**. Une première réaction de Wittig utilisant le phosphorane **11** (obtenu par réaction du LiHMDS sur le sel de phosphonium **10**) permet d'accéder à l'ester γ, δ – insaturé **12**. Une hydrogénation sous pression de la double liaison conduit à l'ester **13** qui est réduit en alcool **14** à l'aide de LiAlH_4 . Une oxydation (Corey *et al.*, 1975) de l'alcool **14** en aldéhyde **15** suivie d'une réaction de Wittig effectuée à l'aide du phosphorane **17** (obtenu par addition de $n\text{-BuLi}$ sur le sel de phosphonium **16**) conduit à l'oléfine **18**. Comme précédemment, il est à nouveau possible de faire varier la longueur de la chaîne carbonée à volonté au niveau du sel de phosphonium et donc au niveau du phosphorane. Finalement une réaction de déprotection conduit aux 2-alkylcyclobutanones insaturées voulues sous forme d'un mélange *cis/trans* (Figure N°3).

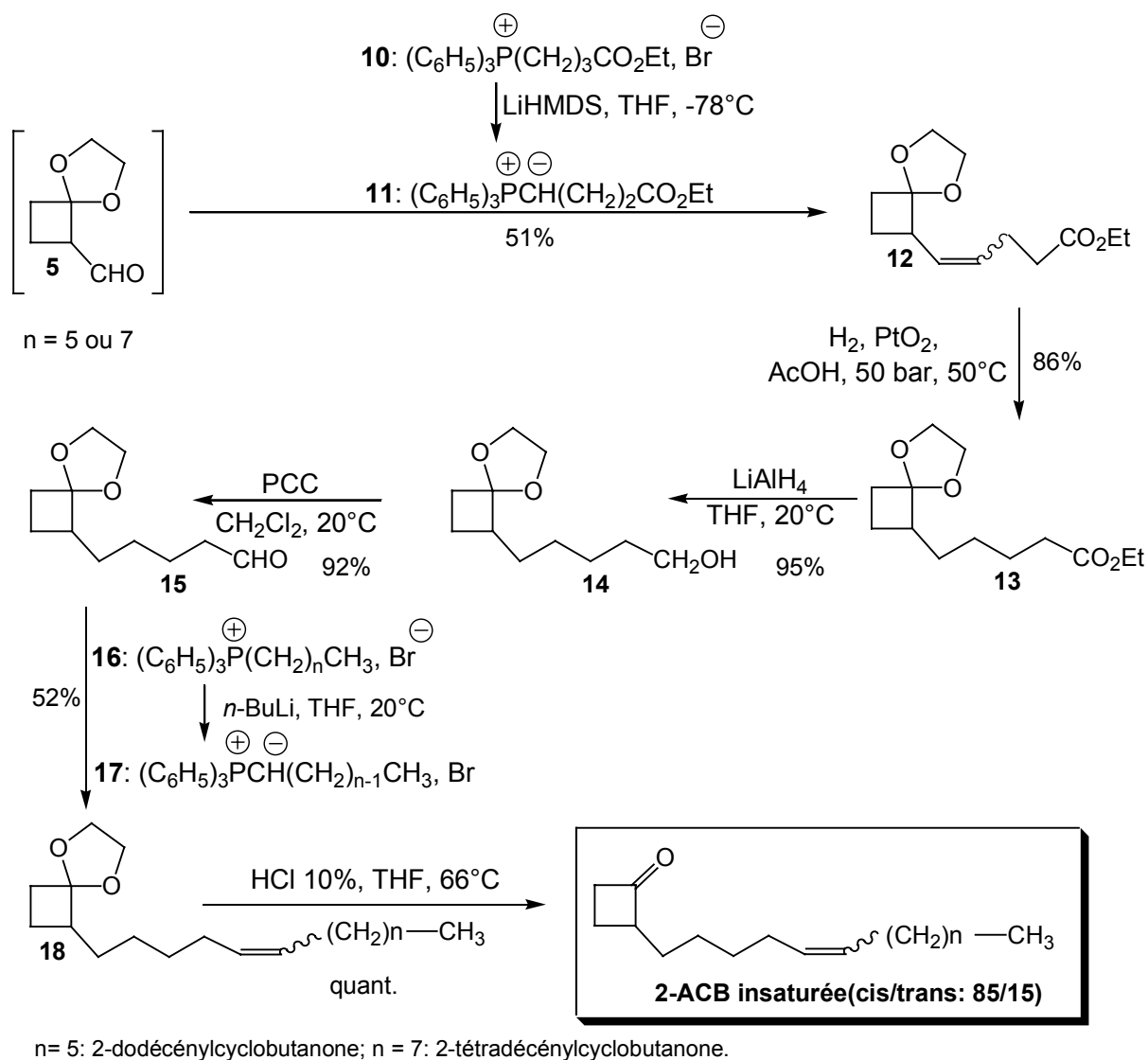


Figure N°3: Synthèse des 2-alkylcyclobutanones à chaîne latérale insaturée.

Cette première suite de réactions permet donc d'accéder aux 2-alkylcyclobutanones mais présente un certain nombre d'inconvénients comme par exemple: le nombre d'étapes (7 à 10), le nombre de chromatographies sur colonne de silice (2 à 7), un "scale-up" des réactions difficile et la faible quantité de produits obtenue par synthèse (environ 500 mg à 600 mg).

Pour remédier à ces inconvénients, nous avons développé une nouvelle suite de réactions utilisant cette fois comme produit de départ la cyclobutanone **19**. Après transformation en hydrazone **20**, une simple réaction d'alkylation effectuée sur le carbanion de l'hydrazone **20** à l'aide de dérivés halogénés **21** permet d'accéder directement aux 2-alkylcyclobutanones après traitement acide (Figure N°4) (Mino *et al.*, 1997).

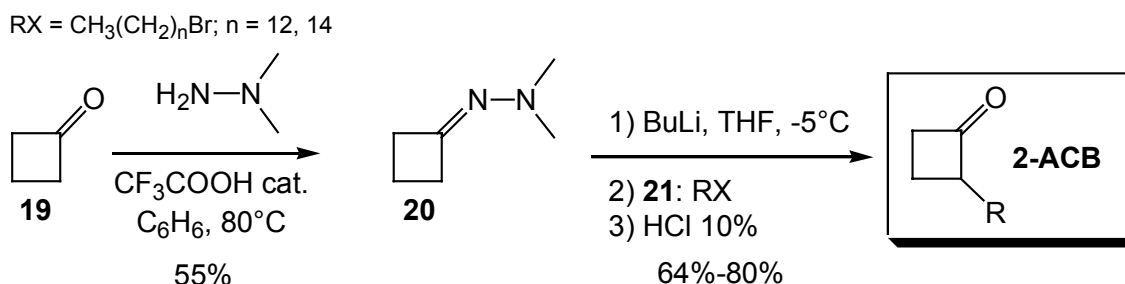


Figure N°4: Deuxième voie de synthèse des 2-alkylcyclobutanones.

L'avantage de cette méthode vient du fait que les dérivés halogénés à chaîne carbonée saturée sont très facilement disponibles (quelle que soit la longueur de la chaîne) et que l'accès aux dérivés halogénés portant une chaîne carbonée insaturée est aisé. Pour ces derniers, le produit de départ utilisé est le pentanediol-1, 5 **22**. Une réaction de monobromation conduit au bromo-alcool **23** (Chong *et al.*, 2000) qui est oxydé (Corey *et al.*, 1975) en aldéhyde **24**. Ce dernier subit une réaction de Wittig (il y a donc possibilité de jouer sur la longueur de la chaîne carbonée) pour conduire aux 1-bromo dodéc-5-ène **25** (précurseur de la 2-dodécényl-cyclobutanone) et le 1-bromo tétradéc-5-ène **26** (précurseur de la 2-tétradécényl-cyclobutanone). L'accès aux 2-alkylcyclobutanones insaturées est alors possible en utilisant la réaction développée ci-dessus. Il faut noter que les 2-alkylcyclobutanones insaturées ainsi synthétisées sont obtenues sous forme d'un mélange d'isomères *cis/trans* (85/15) (Figure N°5).

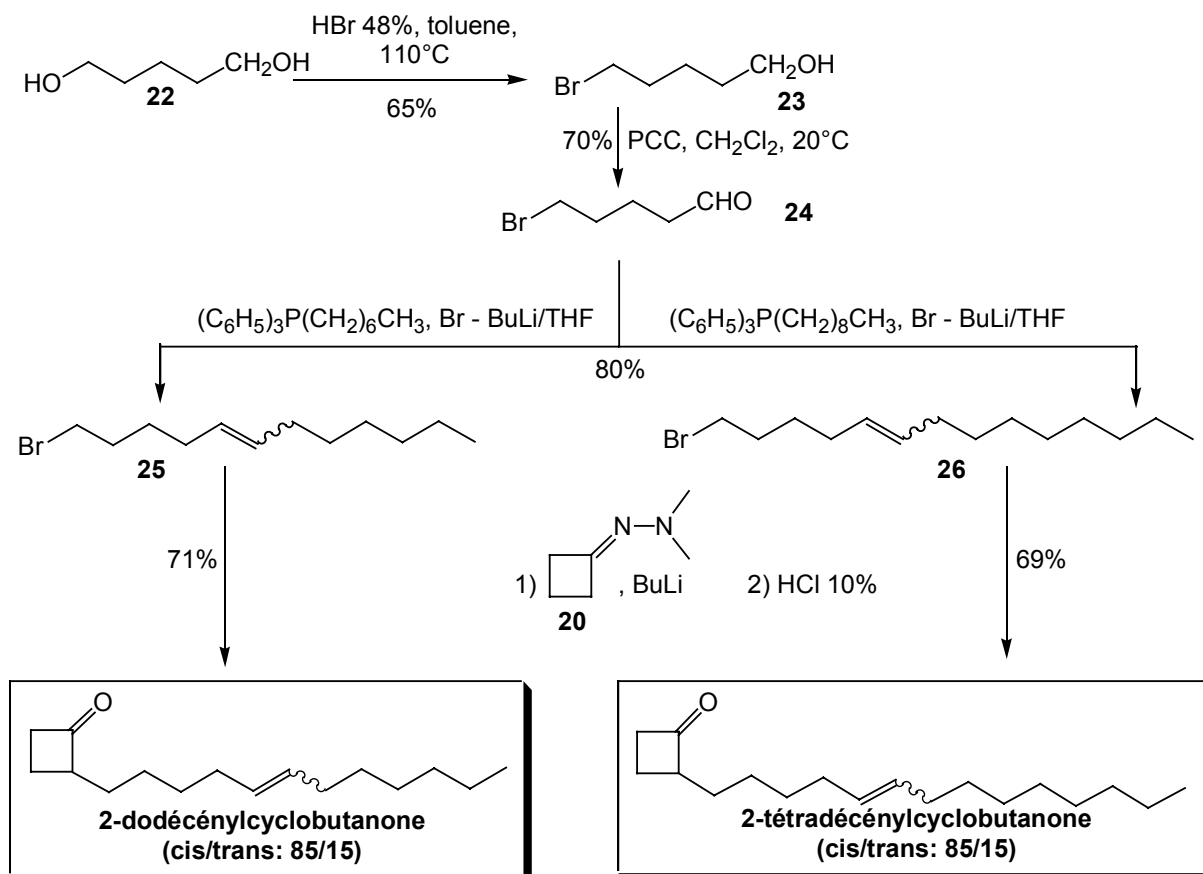


Figure N°5: Nouvelle méthode d'obtention des 2-alkylcyclobutanones insaturées.

En conclusion, la deuxième voie d'accès aux 2-alkylcyclobutanones que nous avons mise au point s'avère être efficace que la première voie de synthèse. En effet, en utilisant la première voie de synthèse, l'obtention de 0,5 g d'alkylcyclobutanone à chaîne latérale saturée demande une semaine de travail et l'obtention de 0,5 g d'alkylcyclobutanone à chaîne latérale insaturée demande deux semaines de travail. Bien entendu, il est possible de lancer plusieurs réactions en parallèle: cependant, nous avons constaté que la purification des différents bruts réactionnels obtenus au cours de cette synthèse est efficace à condition que la masse de produit déposée sur la colonne de silice ne dépasse pas le gramme. Ceci représente donc une sévère limitation à cette voie de synthèse. La deuxième voie de synthèse est plus simple et plus rapide à réaliser car elle nécessite un nombre limité d'étapes (2 étapes pour les 2-ACB saturées, 4 étapes pour les 2-ACB insaturées par rapport à respectivement 7 et 10 étapes pour la première voie de synthèse). Par exemple, l'obtention de 0,5g d'alkylcyclobutanone à chaîne latérale saturée demande 3 jours de travail et l'obtention de 0,5g d'alkylcyclobutanone à chaîne latérale insaturée demande une semaine de travail. Cependant, nous avons été confrontés aux mêmes problèmes de purification

que lors de la première voie de synthèse: ceci représente également une limitation à cette voie de synthèse.

Cette deuxième voie de synthèse nous a permis de "produire" pour les différents partenaires de ce programme Interreg II les 2-ACB nécessaires afin qu'ils puissent effectuer efficacement leurs études.

MATERIEL ET METHODES

Réactifs et généralités.

Toutes les réactions ont été effectuées dans des montages anhydres, sous atmosphère d'argon et avec agitation magnétique.

Tous les réactifs utilisés pour les deux voies de synthèse sont des produits commerciaux Aldrich ou Lancaster ou Avocado.

Les solvants sont distillés de la manière suivante :

- le chlorure de méthylène est distillé sur pentoxyde de phosphore;
- l'éther et le tétrahydrofurane sont distillés sur le couple sodium-benzophénone;
- l'hexane, le toluène et le benzène sont distillés sur hydrure de calcium.

La triéthylamine et la diisopropylamine sont distillées et conservées sur potasse.

Le n-butyllithium (solution commerciale Aldrich 1,6 M dans l'hexane) est dosé avant chaque utilisation par l'acide diphénylacétique.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont faites sur des plaques de gel de silice MERCK 60 F₂₅₄ et sont révélées par UV et par vaporisation d'un mélange vanilline-éthanol-eau-acide sulfurique suivie de chauffage. Le suivi des réactions et la pureté des produits ont été contrôlés à l'aide de ces plaques chromatographiques.

Les séparations par chromatographie sur colonne de silice sont effectuées soit:

- sous moyenne pression avec de la silice Merck (MERCK Si60, 40-63 µm)
- par gravité à l'aide de la silice Merck (MERCK Si60, 63-200 µm)

Les points de fusion (F) ont été mesurés au microscope à platine chauffante REICHERT.

Spectroscopie.

Les spectres infrarouge (IR) ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER IR-881 et sont effectués dans le tétrachlorure de carbone.

Les spectres ultraviolet (UV) ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER UV-550 et sont effectués dans l'acétonitrile.

Les spectres de RMN du proton (¹H RMN) ont été mesurés à 200 MHz (BRUKER AC-200), à 400 MHz (BRUKER DRX-400) ou 500 MHz (BRUKER ARX-500) dans le chloroforme ou dans le benzène deutéré. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les abréviations s, d, t, q et m désignent respectivement les multiplicités : singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet.

Les constantes de couplages (J) sont exprimées en Hertz (Hz).

Les spectres de RMN du carbone (¹³C RMN) ont été mesurés à 50 MHz (BRUKER AC-200), à 100 MHz (BRUKER DRX-400) ou 125 MHz (BRUKER ARX-500) dans le chloroforme ou le benzène deutéré. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane(TMS).

Analyse élémentaire

Les microanalyses ont été effectuées au Service Commun de Microanalyse du CNRS à la Faculté de Chimie de Strasbourg. L'erreur admise sur le résultat est de $\pm 0.3\%$.

Modes opératoires

* Première voie de synthèse

Nous allons décrire le mode opératoire utilisé pour l'obtention de la 2-tétradécylcyclobutanone. Pour obtenir les autres 2-ACB (à savoir les 2-hexyl, 2-heptyl, 2-octyl, 2-décyl, 2-undécyl, 2-dodécylcyclobutanones) il faut simplement modifier la longueur de la chaîne carbonée des phosphoranes utilisés (obtenus par addition de n-BuLi sur les sels de phosphonium correspondants qui sont des produits commerciaux Lancaster) et suivre le mode opératoire décrit ci-dessous.

Synthèse de la 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB)

Oléfine 8.

Le DMSO (880 mg; 11,26 mmoles) est additionné goutte à goutte au chlorure d'oxalyle (1,43 g; 11,26 mmoles) en solution dans du CH_2Cl_2 (10 mL) à -78°C . Le mélange réactionnel est agité 10 min à -78°C avant que l'alcool **4** (1,35g; 9,38 mmoles) (Kirmse and Schneider, 1969) soit ajouté au goutte à goutte à cette température. Le mélange réactionnel est agité 30 min à -78°C . La triéthylamine (2,85 g; 28,16 mmoles) est ajoutée goutte à goutte et l'agitation est poursuivie pendant 30 min, ce qui conduit à l'aldéhyde **5** qui n'est pas isolé mais directement transféré par cannulation à -78°C sur le n-tridécylphosphorane [obtenu par addition de n-butyllithium (1,4 M; 14 mL; 20 mmoles) sur le bromure de n-tridécylphosphonium (11,50 g; 21,90 mmoles) à température ambiante en solution dans le THF (20 mL). Après retour lent à température ambiante (10 h à 15 h), le mélange réactionnel est versé sur une solution mi-saturée de NH_4Cl (100 mL). Après extraction à l'éther (4x30 mL), séchage sur MgSO_4 et évaporation des solvants ($25^\circ\text{C}/15$ mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (60 g SiO_2 ; hexane). Ceci permet d'isoler l'oléfine **8** (1,305 g; 4,24 mmoles; $n = 12$; rendement : 45%).

Oléfine 8 : $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en % : C: 77,87; H: 11,76; trouvée: C: 77,5; H: 11,8; IR (CCl_4) : 2926 (s); 2854 (s); 1538 (m); 1466 (m); 1273 (s) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : 5,60-5,30 (2H, m, $-\text{CH}=\text{CH}-$); 4,00-3,80 (4H, m, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3,40 [1H, q, $J \sim 7,5$ Hz, $-\text{CH}-\text{C}(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$]; 2,40-2,10 [2H, m, $-\text{CH}_2-\text{C}(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$]; 1,60-1,15 (24H, m); 0,88 [3H, t, $J \sim 7$ Hz, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}$] ppm.

Dioxolane 9

L'oléfine **8** (743 mg; 2,41 mmoles) est mise en solution dans l'acide acétique (15 mL) contenant du PtO_2 . Après mise sous pression d'hydrogène (45 bar) et chauffage à 50°C pendant 8 h, le mélange réactionnel est filtré sur célite. Après addition d'eau (20 mL) et extraction à l'hexane (4x10 mL), la phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 (2x20 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (20 mL). Après séchage sur MgSO_4 , filtration et évaporation des solvants ($25^\circ\text{C}/15$ mm Hg), la cyclobutanone protégée **9** est obtenue (748 mg; 2,41 mmoles; rendement: quant.) et utilisée telle quelle pour l'étape suivante.

Dioxolane 9 : $C_{20}H_{38}O_2$, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 77,36; H: 12,33; trouvée: C: 77,4; H: 12,5; IR (CCl_4) : 2925 (s); 2854 (s); 1538 (m); 1466 (m); 1273 (s) cm^{-1} ; 1H -NMR ($CDCl_3$) : 4,00-3,80 (4H, m, -O- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 -O-); 2,60-2,40 [1H, m, - \underline{CH} -C(-O- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 -O-)]; 2,15-2,05 [2H, m, - \underline{CH}_2 -C(-O- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 -O-)]; 1,90-1,70 (1H, m); 1,60-1,15 (27H, m); 0,88 [3H, t, J~7 Hz, \underline{CH}_3 (\underline{CH}_2 -)₁₃] ppm.

2-tétradécylcyclobutanone

Au composé **9** (748 mg; 2,41 mmoles) en solution dans le THF (20 mL) et ajouté du HCl à 10% (10 mL). Après 4h de reflux puis retour à température ambiante, le mélange réactionnel est versé sur une solution saturée de $NaHCO_3$ (50 mL). Après extraction à l'éther (3x30 mL), séchage sur $MgSO_4$, filtration et évaporation des solvants (25°C/15 mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (30 g SiO_2 , hexane), ce qui permet d'isoler la 2-tétradécylcyclobutanone (n = 12; 616 mg; 2,31 mmoles; rendement: 95%).

2-tétradécylcyclobutanone : $C_{18}H_{34}O$, cristaux incolores (F = 37°C); analyse élémentaire calculée en % : C: 81,13; H: 12,86; trouvée: C: 81,3; H: 13,0; IR (CCl_4) : 2926 (s); 2854 (s); 1783 (s); 1466 (m); 1088 (w) cm^{-1} ; 1H -NMR ($CDCl_3$) : 3,40-3,20 (1H, m, - \underline{CH} -CO-); 3,20-2,80 (2H, m, - \underline{CH}_2 -CO-); 2,18 (1H, ddd, J~6 Hz, 10 Hz, 15 Hz, - \underline{CH} - \underline{CH}_2 -CO-); 1,80-1,35 (3H, m); 1,25 (24H, sl); 0,88 [3H, t, J~7Hz, \underline{CH}_3 (\underline{CH}_2 -)₁₃] ppm.

Synthèse de la 2- tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB)

Nous allons décrire le mode opératoire utilisé pour l'obtention de la 2- tétradécénylcyclobutanone. Pour obtenir la 2-dodécénylcyclobutanone (2-dDeCB), il suffit de remplacer le bromure de n-nonyltriphénylphosphonium par le bromure de n-heptyltriphénylphosphonium et de suivre le mode opératoire décrit ci-dessous.

Oléfine 12

Au chlorure d'oxalyle (1,43 g ; 11,26 mmoles) en solution dans le chlorure de méthylène (10 mL) est ajouté à -78° C le DMSO (880 mg ; 11,26 mmoles). Après 10 minutes d'agitation à -78° C, l'alcool **4** (1,35 g ; 9,38 mmoles) est ajouté goutte à goutte à cette température. Après 30 minutes d'agitation à -78° C, la triéthylamine (2,85 g ; 28,16 mmoles) est ajoutée goutte à goutte et l'agitation est maintenue 30 minutes ce qui conduit à l'aldéhyde **5**. Ce dernier n'est pas isolé mais directement canulé sur le phosphorane **11** [obtenu par addition à -78°C de LiHMDS (solution 1M dans le THF ; 23 mL ; 23 mmoles) sur le sel de phosphonium **10** (9,70 g ; 21,30 mmoles) en solution dans le THF (20 mL)] à -78° C. Après un retour lent (10 h à 15 h) à température ambiante, le mélange réactionnel est versé sur une solution mi-saturée de NH_4Cl (100 mL), extrait à l'éther (4x30 mL), puis séché sur $MgSO_4$. Après élimination des solvants (25° C/15 mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (60 g SiO_2 ; hexane) ce qui permet d'isoler l'oléfine **12** (1,141g ; 475 mmoles ; rendement : 51 %).

Oléfine 12 : $C_{13}H_{20}O_4$, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en % : C: 64,98; H: 8,39; trouvée: C: 65,1; H: 8,5; IR (CCl_4) : ν (C=O) : 1733 cm^{-1} ; 1H -NMR ($CDCl_3$) : 5,63-5,33 (2H, m, $\underline{CH}=\underline{CH}$); 4,05 (2H, q, J~7 Hz, -COO- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_3); 3,98-3,77 (4H, m, -O- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_2 -O-); 3,35 (1H, q, J~8,6 Hz, - \underline{CH} -CH=CH-); 2,46-2,15 (6H, m); 1,90 (1H, td, J~5 Hz, 11 Hz); 1,50 (1H, dd, J~9 Hz, 11 Hz); 1,25 (3H, t, J~7 Hz, -COO- \underline{CH}_2 - \underline{CH}_3) ppm.

Ester 13

L'oléfine **12** (617 mg ; 2,57 mmoles) est mise en solution dans de l'acide acétique (15 mL) contenant du PtO₂ (5 mg). Après mise sous pression d'hydrogène (50 bar) et chauffage à 50° C pendant 7 heures, le mélange réactionnel est filtré sur célite. Après addition d'eau (20 mL) et extraction au chlorure de méthylène (4 x 10 mL), les phases organiques sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ (2 x 20 mL), puis avec une solution saturée de NaCl (20 mL) et séchées sur MgSO₄ puis filtrées. Après évaporation des solvants (25°C/15 mm Hg) le brut réactionnel est directement traité par de l'éthylène glycol (186 mg; 3,00 mmoles) à reflux de benzène (50 mL) en présence de pTsOH (5 mg). Après 3 heures de reflux sous Dean-Stark, le mélange réactionnel est versé sur une solution mi-saturée de NaHCO₃ (40 mL). Après extraction au CH₂Cl₂ (3x20 mL), lavage avec une solution saturée de NaHCO₃ (20 mL), séchage sur MgSO₄ et élimination des solvants (25°C, 15 mm Hg), le brut réactionnel (747 mg) est chromatographié sur colonne de silice (SiO₂, 60 g) ce qui permet d'isoler le composé **13** (545 mg, 2,25 mmoles; rendement: 86%).

Ester 13 : C₁₃H₂₂O₄, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 64,44; H: 9,15; trouvée: C: 64,2; H: 9,0; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1733 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 4,12 (2H, q, J~7 Hz, -COO-CH₂-CH₃); 3,90-3,83 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,50 [1H, q, J~7,5 Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,29(2H, t, J~7,5 Hz, -CH₂-CO₂-C₂H₅); 2,18-2,10 (2H, m); 1,90-1,15 (8H, m); 1,25 (3H, t, J~7 Hz, -COO-CH₂-CH₃) ppm.

Alcool 14

A l'ester **13** (1,465 g ; 6,05 mmoles) en solution dans le THF (30 mL) est ajouté à 0°C LiAlH₄ (820 mg ; 8,47 mmoles). Le bain de glace est enlevé et après 15 min. d'agitation à 25°C, le mélange réactionnel est hydrolysé (335 μ l H₂O ; 335 μ l NaOH à 15%; 1007 μ l H₂O). Après filtration sur célite, lavage du filtrat avec CH₂Cl₂ (4x20 mL) séchage sur MgSO₄ et évaporation des solvants (25°C/15 mm Hg) le brut réactionnel (1,457 g) est chromatographié sur colonne de silice (60 g SiO₂; 15% AcOEt/hexane) ce qui permet d'isoler l'alcool **13** (1,150g ; 5,75 mmoles ; rendement: 95%).

Alcool 14 : C₁₁H₂₀O₃, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en % : C: 65,97; H: 10,07; trouvée: C: 66,1; H: 9,8; ¹H-NMR (CDCl₃) : 3,95-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,62 (2H, t, J~7 Hz, -CH₂-OH); 2,52 [1H, q, J~7,5 Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,20-2,10 (2H, m); 1,90-1,15 (11H, m) ppm.

Aldéhyde 15

L'alcool **14** (700 mg ; 3,50 mmoles) en solution dans du CH₂Cl₂ (15 mL) est ajouté à 25°C au PCC (1,51g ; 7,00 mmoles) en suspension dans le CH₂Cl₂ (70 mL). Après une heure d'agitation à 25°C, de l'éther (150 mL) est ajouté au mélange réactionnel. Après filtration sur célite et élimination des solvants (25°C/15 mm Hg) le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (60 g SiO₂; 15% AcOEt/hexane) ce qui permet d'isoler l'aldéhyde **15** (638 mg ; 3,22 mmoles ; rendement: 92%)

Aldéhyde 15 : C₁₁H₁₈O₃, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 66,64; H: 9,15; trouvée: C: 66,8; H: 9,4; ¹H-NMR (CDCl₃) : 9,76 (1H, t, J~2 Hz, -CHO-); 3,95 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,55-2,35 (3H, m); 2,20-2,05 (2H, m); 1,85-1,20 (8H, m) ppm.

Oléfine 18

Au bromure de n-nonyltriphénylphosphonium **16** (3,32 g ; 7,084 mmoles) en solution dans du THF (60 mL) est additionné au goutte à goutte à 25°C le n-BuLi (1,42M ; 5,23 mL ; 7,43 mmoles). Après une heure d'agitation à 25°C, l'aldéhyde **15** (638 mg ; 3,22 mmoles) en solution dans le THF (15 mL) est ajouté au goutte à goutte à 25°C. Après 30 min. d'agitation à 25°C, le mélange réactionnel est hydrolysé à l'aide d'une solution mi-saturée de NH₄Cl (80 mL). Après extraction à l'éther (4x25 mL), lavage à l'eau (50 mL) puis avec une solution saturée de NaCl (50 mL), séchage sur MgSO₄ puis élimination des solvants (25°C/15 mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (80g SiO₂; hexane) ce qui permet d'isoler l'oléfine **18** (517 mg ; 1,68 mmoles ; rendement: 52%).

Oléfine 18 : C₂₀H₃₆O₂, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en % : C: 77,87; H: 11,76; trouvée: C: 78,0; H: 11,6; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,43-5,27 (2H, m, -CH=CH-); 3,98-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,52 [1H, q, J~7 Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,27-1,90 (5H, m); 1,85-1,72 (1H, m); 1,65-1,05 (20H, m); 0,87 [3H, t, J~7 Hz, CH₃(CH₂)₇] ppm.

2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB).

A l'oléfine **18** (500 mg ; 1,62 mmoles) en solution dans le THF (75 mL) est ajouté du HCl à 10% (30 mL). Après 3 heures à 30°C, le mélange réactionnel est neutralisé à l'aide d'une solution saturée de NaHCO₃. Après extraction à l'éther (3x7 mL), séchage sur MgSO₄ et évaporation des solvants (25°C/15 mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice, ce qui permet d'isoler la 2-tétradécénylcyclobutanone (428 mg ; 1,62 mmoles ; rendement: quant.).

2-tétradécénylcyclobutanone.: C₁₈H₃₂O, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 81,75; H: 12,20; trouvée: C: 81,7; H: 12,3; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1779 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃): 5,43-5,26 (2H, m, -CH=CH-); 3,40-3,17 (1H, m, -CH-CO-); 3,13-2,81 (2H, m, -CH₂-CO-); 2,27-1,85 (5H, m); 1,75-1,15 (1H, m); 1,65-1,05 (19H, m); 0,87 [3H, t, J~7 Hz, CH₃(CH₂)₁₃] ppm.

* Deuxième voie de synthèse

Hydrazone 20

La cyclobutanone **19** (4,773 g, 68,18 mmoles) est mise en solution dans le benzène (100 mL). A cette solution est ajoutée la N, N-diméthylhydrazine (4,91 g, 81,82 mmoles) et de l'acide trifluoroacétique (0,05 mL). Le mélange est porté à reflux pendant 5 h dans un montage équipé d'un Dean-Stark. Après retour à température ambiante, de l'éther (100 mL) puis de l'eau sont ajoutés (40 mL). La phase organique est extraite, lavée avec une solution saturée de NaCl (2x20 mL) puis séchée sur MgSO₄. Une évaporation des solvants sous pression réduite (25°C, 20 mm Hg) suivie d'une distillation sous pression réduite permet de récupérer l'hydrazone **20** (B.P.: 53°C/25mmHg; 4,216 g, 37,64 mmoles; rendement: 55%).

Les données spectroscopiques de l'hydrazone **20** sont en accord avec celles décrites dans la littérature (Mino *et al.*, 1997).

2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB)

A une solution d'hydrazone **20** (900 mg, 8,02 mmoles) dans le THF (100 mL) est ajoutée goutte à goutte du n-BuLi (solution 1,6 M dans l'hexane; 7,26 mL) à -5°C. Après une heure d'agitation à cette température, le 1-bromotétradécane (2,30 g, 8,30 mmoles) est ajouté à -5°C. Le mélange réactionnel est alors agité pendant 20 h à température ambiante. De l'HCl 2N (20 mL) est en suite rajouté et le mélange réactionnel est agité 1 h à température ambiante. Après extraction à l'éther (3x20 mL), suivie d'un lavage à l'eau (3x20 mL) puis d'un lavage à l'aide d'une solution saturée de NaCl (2x20 mL), la phase organique est séchée sur MgSO₄. Une évaporation des solvants (25°C/15 mm Hg) suivie d'une chromatographie sur colonne de silice (30 g SiO₂, hexane) du brut réactionnel (2,869 g) permet d'isoler la 2-tétradécylcyclobutanone (1,377 g, 5,17 mmoles; rendement: 64%).

L'obtention des autres 2-ACB s'effectue selon le même mode opératoire en utilisant des dérivés halogénés possédant les longueurs de chaînes voulues.

2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB) et 2-dodécénylcyclobutanone (2-dDeCB).

a) préparation des oléfines **25** et **26**

Le 5-bromo-pentanol-1 **23** a été préparé selon la méthode décrite par Chong *et al.*, 2000

A température ambiante, au chlorochromate de pyridinium (7,8 g, 0,036 mole) en suspension dans du CH₂Cl₂ (300 mL) est ajouté au goutte à goutte le 5-bromo-pentanol-1 **23** (3,0 g, 0,018 mole) en solution dans du CH₂Cl₂ (30 mL). Après 1 heure d'agitation à température ambiante, le mélange réactionnel est versé sur de l'éther (500 mL) puis filtré sur célite. Après évaporation des solvants (25°C, 15 mm Hg) le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (SiO₂, hexane à 10% AcOEt) ce qui permet d'isoler l'aldéhyde **24** (2,1 g, 12,72 mmoles, rendement: 70%).

Aldéhyde 24 : C₅H₉BrO, liquide incolore,

IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; analyse élémentaire calculée en %: C: 36,39; H: 5,50; trouvée: C: 36,5; H: 5,28. ¹H-NMR (CDCl₃) : 9,77 (1H, t, J=1.5Hz, CHO); 3,40 (2H, t, J=7Hz, CH₂Br); 2,50 (2H, td, J= 7Hz, 1.5Hz, CH₂CHO); 2,00-1,20 (4H, m).

Oléfine **26**

Le bromure de n-nonyltriphénylphosphonium (6,54 g, 13,9 mmoles) est mis en suspension dans du THF (270 mL). A température ambiante, du n-BuLi (solution 1,51M dans l'hexane, 8,1 mL, 12,20 mmoles) est ajouté au goutte à goutte. La solution, incolore au départ, vire au rouge sombre. Après 10 minutes d'agitation à température ambiante l'aldéhyde **24** (1,917 g, 11,60 mmoles) en solution dans le THF (20 mL) est ajouté au goutte à goutte à température ambiante. Le mélange réactionnel est agité 20 h à température ambiante. A ce mélange est ajouté successivement une solution saturée de NH₄Cl (200 mL), de l'eau (200 mL) et de l'éther (150 mL). Après extraction à l'éther (2x100 mL), lavage avec une solution saturée de NaCl (150 mL), séchage sur MgSO₄, et évaporation des solvants (25°C, 15 mm Hg), le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice (60 g, SiO₂, hexane) ce qui permet d'isoler l'oléfine **26** (2,594 g, 9,43 mmoles, rendement: 81%, mélange d'isomères *cis/trans*: 85/15.).

Oléfine 26 : C₁₄H₂₇Br, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 61,09; H: 9,89; trouvée: C: 60,9; H: 10,0. IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,22 (2H, m, CH=CH); 3,47 (2H, t, J = 7Hz, CH₂Br); 2,20-1,80 (6H, m); 1,60-1,40 (2H, m); 1,40-1,30 (12H, m); 0,91 (3H, t, J = 7Hz, CH₃).

L'oléfine **25** est obtenue en utilisant le même mode opératoire au départ de bromure de n-heptyl-triphénylphosphonium. L'oléfine **25** est isolée avec un rendement du même ordre de grandeur (80%).

Oléfine 25 : C₁₂H₂₃Br, liquide incolore; analyse élémentaire calculée en %: C: 58,30; H: 9,38; trouvée: C: 58,1; H: 9,5. IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,22 (2H, m, CH=CH); 3,47 (2H, t, J=7Hz, CH₂Br); 2,20-1,80 (6H, m); 1,60-1,40 (2H, m); 1,40-1,30 (8H, m); 0,91 (3H, t, J=7Hz, CH₃).

b) préparation de la 2-dodécénylcyclobutanone (2-dDeCB) et de la 2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB).

L'obtention de la 2-dodécénylcyclobutanone et de la 2-tétradécénylcyclobutanone s'effectue selon le mode opératoire décrit ci dessus en utilisant respectivement comme agent alkylant les oléfines **25** et **26**. En partant de l'hydrazone **20** (200 mg, 1,79 mmoles) la 2-dodécénylcyclobutanone est obtenue avec 71% de rendement (302 mg, 1,28 mmoles). En partant de l'hydrazone **20** (462 mg, 4,13 mmoles) la 2-tétradécénylcyclobutanone est obtenue avec 69% de rendement (755 mg, 2,85 mmoles).

Les données spectroscopiques des différentes 2-ACB synthétisées sont en accord avec les données de la littérature.

* Préparation de la 5-tétradécyl-oxolan-2-one (ou γ -stéarique-lactone ou encore γ -stéarolactone)

Le produit de dégradation de la tétradécylcyclobutanone, la 5-tétradécyl-oxolan-2-one, a été préparée selon la méthode proposée dans la littérature par Granata *et al.* (1994).

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Mesdames M. Wittmann, A. Perez et L. Miesch et Monsieur J. Montalt pour leur assistance technique, écoute et conseils.

RÉFÉRENCES

Boyd R.D., Crone A.V.J., Hamilton J.T.G., Hand M.V., Stevenson M.H., Stevenson P.J. (1991), Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken, *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 789-792.

Chong J.M., Heuft M.A., Rabbat P. (2000), Solvent effects on the monobromination of α , ω -diols: a convenient preparation of ω -bromoalkanols, *J. Org. Chem.*, **65**, 5837-5838.

Corey E.J., Suggs J.W. (1975), Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 2647-2650.

Crone A.V.J., Hand M.V., Hamilton J.T.G., Sharma N.D., Boyd D.R., Stevenson M.H., (1993), Synthesis, characterization and use of 2-tetradecylcyclobutanone together with other cyclobutanones as markers of irradiated liquid whole egg, *J. Sci. Food Agr.*, **62**, 361-367.

Granata A., Sauriol F., Perlin A.S. (1994), Acid-catalysed transformation of oleic acid, and 12-hydroxystearic acid, into γ -octadecanolactone. Evidence for occurrence of a novel side reaction, *Can. J. Chem.*, **72**, 1684-1690.

Gruseck U., Heuschmann M. (1990), Preparation of donor-acceptor substituted vinylcyclobutanes. *Chem. Ber.*, **123**, 1905-1909

Hamilton L., Stevenson M.H., Boyd D.R., Brannigan I.N., Treacy A.B., Hamilton J.T.G., McRobert W.C., Elliot C.T. (1996), Detection of 2-substituted cyclobutanones as irradiation products of lipid-containing foods: synthesis and applications of *cis*- and *trans*-2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanones and 11-(2'-oxocyclobutyl)-undecanoic acid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 139-146.

Kirmse W., Schneider S. (1969), Eliminierungsreaktionen an 2-tosyloxymethyl-cycloalkanon acetalen, *Chem. Ber.*, **102**, 2440-2448

Kumar V., Dev S. (1987) Chemistry of ayurvedic crude drugs, *Tetrahedron*, **43**, 5933-5948.

Miesch M., Ndiaye B., Hasselmann C., Marchioni E. (1999), 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. I. Synthesis of saturated and unsaturated standards, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.

Mino T., Masuda S., Nishio M., Yamashita M. (1997), Synthesis of lactones by Baeyer-Villiger oxydation with magnesium monophtalate hexahydrate, *J. Org. Chem.*, **62**, 2633-2635.

2.2 SEPARATION DES ISOMERES *CIS* ET *TRANS* DE LA 2-TETRADECENYLCYCLOBUTANONE

Eric Marchioni et Péter Horvatovich

Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

Cinq 2-alkylcyclobutanones, la 2-dDCB, la 2-dDeCB, la 2-tDCB, la *cis*-2-tDeCB et la *trans*-2-tDeCB, ont été utilisées comme substances tests. Ce choix a été effectué afin de pouvoir mettre en évidence un éventuel effet de la présence d'une double liaison sur la chaîne alkyle (2-dDCB/2-dDeCB, 2-tDCB/2-tDeCB) ou de l'isomérisation *cis-trans* (*cis*-2-tDeCB/*trans*-2-tDeCB) sur la toxicité de ces molécules (la *trans*-2-tDeCB ne se forme pas lors de la radiolyse de la matière grasse mais sa présence peut résulter d'une isomérisation de la forme *cis* de l'acide gras insaturé précurseur, à la suite d'un traitement thermique ou d'hydrogénation de l'aliment avant son ionisation par exemple).

La méthode de synthèse décrite précédemment ne permet pourtant pas d'obtenir purs les isomères *cis* et *trans* de la 2-tDeCB [la seule méthode publiée pour la synthèse de la *cis*-2-tDeCB a un rendement désastreux (1%) (Hamilton *et al.*, 1995) et ne saurait être utilisée pour préparer les quelques dizaines de mg de chaque isomère nécessaires aux études toxicologiques]. Il a donc été nécessaire de procéder à un fractionnement de ce mélange d'isomères *cis* et *trans*.

Cette séparation a été effectuée par extraction en phase solide sur échangeur de cations imprégné d'ions argent, technique déjà utilisée pour la séparation des 2-alkylcyclobutanones à chaînes alkyles saturée et insaturée (Ndiaye *et al.*, 1999a) et pour la séparation des formes *cis* et *trans* de l'ester méthylique de l'acide oléique (Ulberth et Achs, 1990).

L'échangeur de cations SCX (acide benzène sulfonique, 50 µm, cat. n°: 9530-0025) a été fourni par International Sorbent Technology Ltd (Mid Glamorgan, Grande-Bretagne). Quatre g de cet échangeur de cations ont été déposés sur le fritté d'une colonne de verre de 200 mm de long, de 22 mm de diamètre (volume utile 130 ml), équipée d'un robinet et entourée de papier aluminium, puis conditionnés successivement par 40 ml d'une solution aqueuse à 1% d'acétate d'ammonium (cat. n°: 1116, Merck) et 40 ml d'eau distillée. Un rinçage avec 8 ml d'une solution aqueuse (1%, m/v) de nitrate d'argent (cat. n°: S-6506, Sigma) a permis de charger cet échangeur de cations en ions Ag⁺. La colonne a ensuite été lavée avec 10 ml de méthanol (cat. n°: 525102, Carlo Erba, Rodano, Italie), 10 ml de TBME (cat. n°: 1.01845.2500, Merck) et enfin 10 ml de *n*-hexane (distillé au laboratoire).

Une solution hexanique contenant 6 mg de 2-tDeCB (mélange *cis/trans*) a été déposée sur la colonne échangeuse de cations imprégnée d'ions d'argent (il a été montré qu'une telle colonne était capable de retenir au maximum 8 mg de 2-tDeCB). L'élution a été réalisée avec des phases mobiles de polarité croissante:

- 30 ml de *n*-hexane/TBME (90:10 v/v) (fraction 1)
- 6×20 ml de *n*-hexane/TBME (88:12 v/v) (fractions 2 à 7)
- 2×50 ml de TBME (fractions 8 à 9).

N.B. Les colonnes, lavées après utilisation par 50 ml de TBME et conservées à l'abri de la lumière grâce à la feuille d'aluminium afin d'éviter toute réduction des ions Ag⁺, ont été réutilisables six fois.

Les différentes fractions ont été recueillies dans des ballons à fond plat de 100 ml. A chaque fraction ont été ajoutés 200 µl d'une solution de 2-OCB à 0,5 µg·ml⁻¹ (étalon interne). Un µl de ce mélange a ensuite été analysé par CPG/FID à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de marque Varian (type 3300, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (300°C) et d'un injecteur de type split-splitless chauffé à 250°C (injection en mode "splitless" maintenu pendant 0,75 min, puis passage en mode "split" maintenu durant

tout le reste de l'analyse). Une colonne capillaire DB-5, de 30 m de longueur et de 0,25 mm de diamètre intérieur (phase stationnaire 5% diphényl-95% diméthylpolysiloxane de 0,25 μm d'épaisseur, cat. n°: 122-5032, J&W Scientific, Folsom, Californie, USA) a été utilisée. La température initiale de la colonne (maintenue pendant 2 min) a été de 50°C. Elle a subi une augmentation de température de 8°C·min⁻¹ jusqu'à atteindre 300°C, température finale maintenue pendant 5 min. Le volume d'injection a été de 1 μl . Le gaz vecteur utilisé était de l'azote (pureté de 99,999%, Air Liquide) avec un débit de 1 ml·min⁻¹. Le détecteur à ionisation de flamme a été alimenté par de l'hydrogène (30 ml·min⁻¹) (qualité 99,999%, Air Liquide) et par un mélange azote/oxygène (qualité 99,999%, Air Liquide, 300 ml·min⁻¹). Le gaz "make-up" était de l'azote (30 ml·min⁻¹) (qualité 99,999%, Air Liquide). Le pourcentage de chacun des isomères *cis* ou *trans* dans chaque fraction est donné dans la Figure N°6.

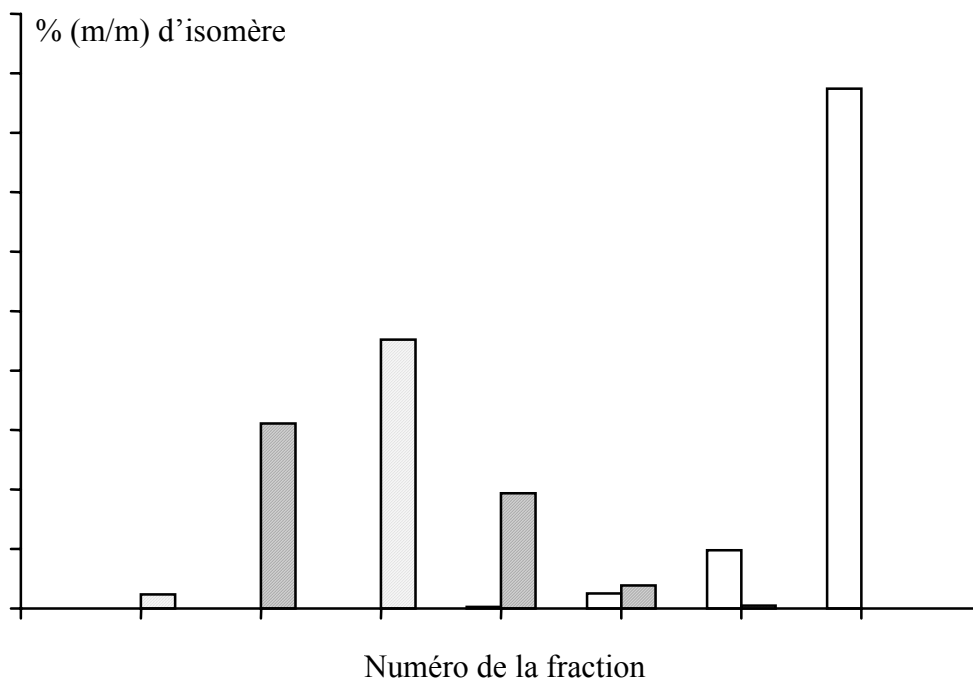


Figure N°6 : Pourcentages des isomères *cis* □ et *trans* ▨ de la 2-tDeCB dans les différentes fractions d'éluat après extraction en phase solide sur échangeur de cations imprégné d'ions Ag⁺.

Les fractions 2, 3 et 4 (contenant 80% de la *trans*-2-tDeCB initialement présente dans l'échantillon analysé) ont été regroupées et concentrées. Il en a été de même pour les fractions 7 et 8 (contenant 97% de la *cis*-2-tDeCB initialement présente dans l'échantillon analysé).

En ce qui concerne les fractions 5 et 6, elles ont été concentrées, après regroupement, et soumises à une nouvelle extraction en phase solide, ce qui a permis une meilleure récupération de la *trans*-2-tDeCB, dont la quantité dans le mélange d'isomères est modeste.

L'itération (une cinquantaine de fois) de cette opération d'extraction en phase solide a permis finalement d'obtenir 44 mg de *trans*-2-tDeCB (pureté 99%) et 220 mg de *cis*-2-tDeCB (pureté 98%) à partir de 300 mg d'un mélange d'isomères (rendements de 98% pour la *trans*-2-tDeCB et de 86 % pour la *cis*-2-tDeCB). La pureté des deux isomères obtenus (Figure N°7) est nettement supérieure à celle exigée (>95%) pour la réalisation d'études toxicologiques.

Cette méthode originale de séparation des isomères *cis* et *trans* de la 2-tDeCB devrait également faire l'objet d'une publication scientifique.

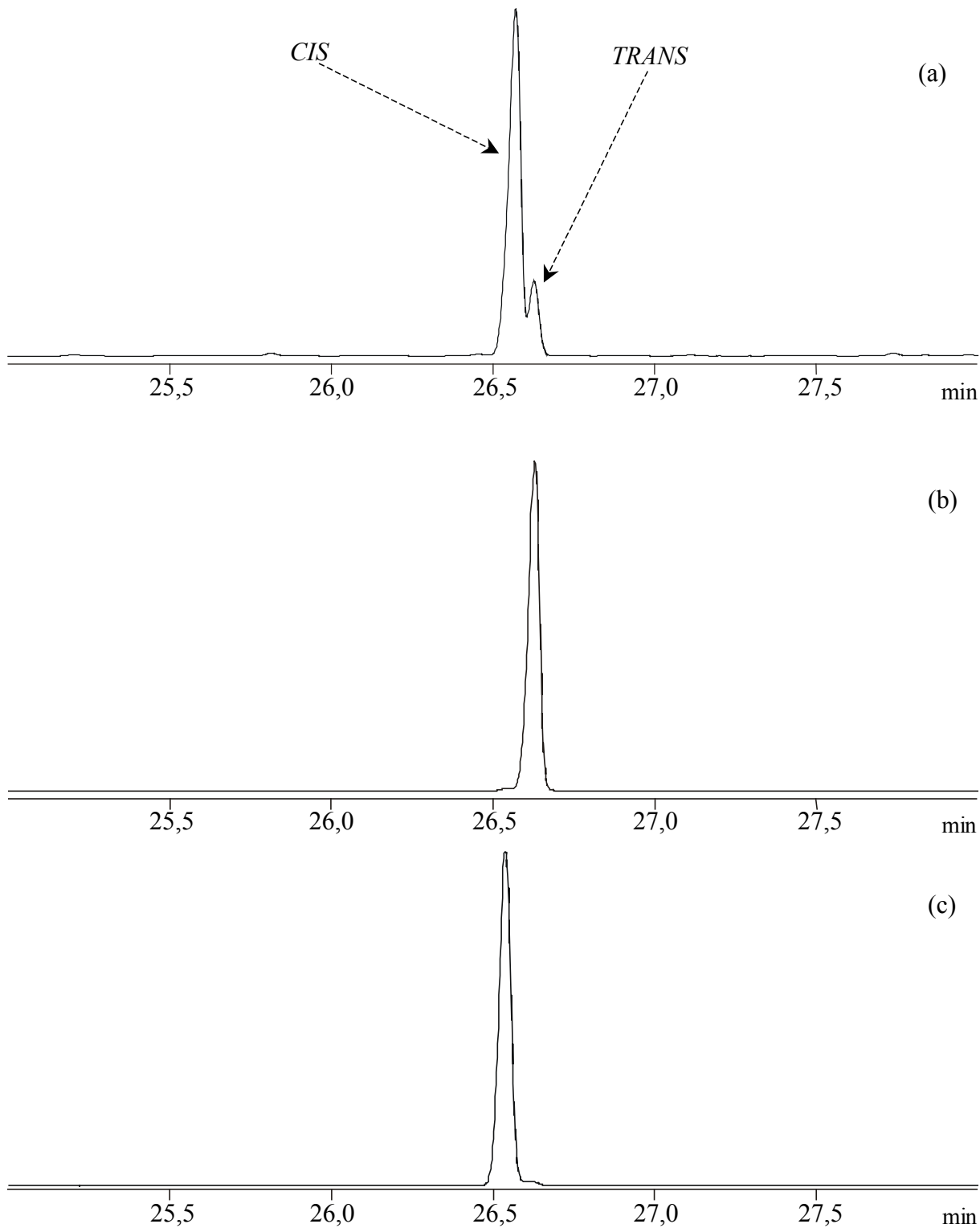


Figure N°7 : Analyse par CPG/FID de la 2-tDeCB de départ (a) et des formes trans-2-tDeCB (b) et cis-2-tDeCB (c) pures obtenues après extraction en phase solide sur échangeur de cations imprégné d'ions Ag^+ .

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Monsieur M.M. Idrissi pour son assistance technique, écoute et conseils.

RÉFÉRENCES

Hamilton L., Stevenson M.H., Boyd D.R., Brannigan I.N., Treacy A.B., Hamilton J.T.G., McRobert W.C., Elliot C.T. (1996), Detection of 2-substituted cyclobutanones as irradiation products of lipid-containing foods: synthesis and applications of *cis*- and *trans*-2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanones and 11-(2'-oxocyclobutyl)-undecanoic acid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 139-146.

Ndiaye B., Horvatovich P., Miesch M., Hasselmann C., Marchioni E. (1999), 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs III. Improvement of the field of application on the EN 1785 method by using silver ion chromatography, *J. Chromatogr. A*, **858**, 109-115.

Ulberth F., Achs E. (1990), Argentation chromatography of fatty acid methyl esters using silver-loaded solid-phase extraction columns, *J. Chromatogr.*, **504**, 202-206.

2.3. FOURNITURE DE COMPOSES MARQUES

Il avait été décidé de procéder à la synthèse de la 2-tétradécylcyclobutanone marquée au tritium. Cependant, la synthèse d'un tel composé radioactif nécessite un équipement particulier qui n'est pas disponible dans nos laboratoires. C'est pourquoi il avait été décidé de sous-traiter cette opération au près des services spécialisés du Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay. Le Laboratoire de l'IRCAD (UPR 9001), actuellement le seul demandeur de ce type de composé, a été chargé d'évaluer la quantité de produit (ainsi que son activité spécifique) nécessaire pour réaliser les analyses envisagées. Cependant, lors de la réunion du 2 avril 2001, et cela en raison du peu de temps restant disponible avant la fin du contrat, il a été décidé d'abandonner la synthèse de ces composés marqués.

2.4 FOURNITURE DES COMPOSES SYNTHETISES

Eric Marchioni et Péter Horvatovich

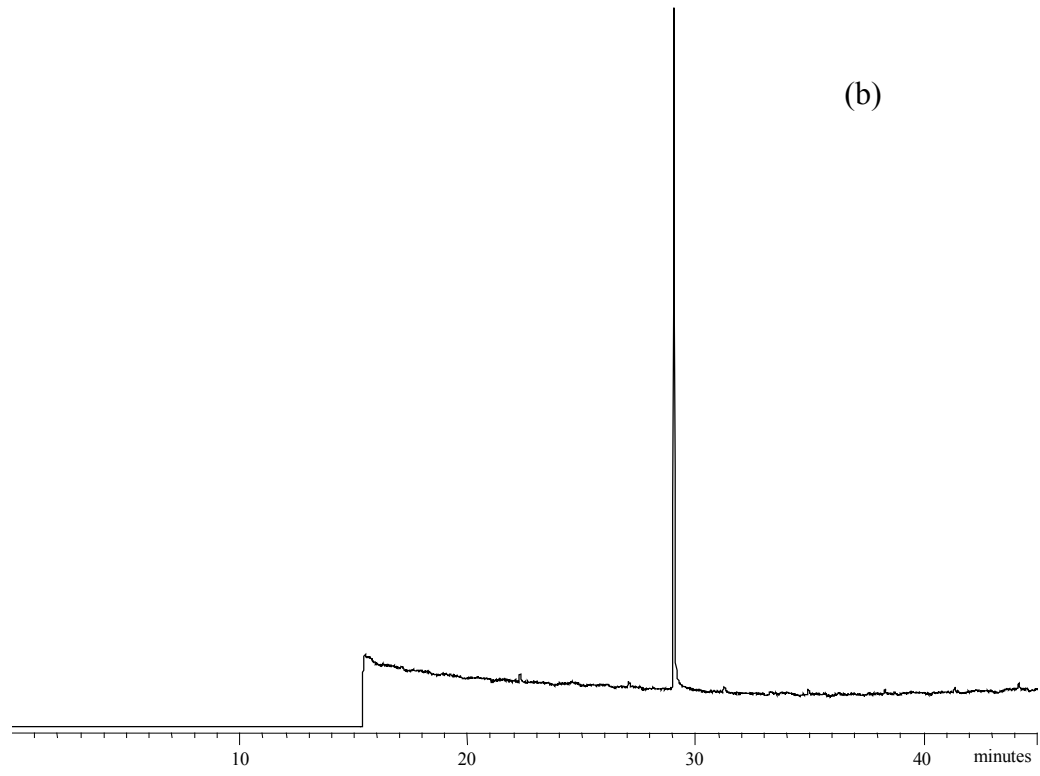
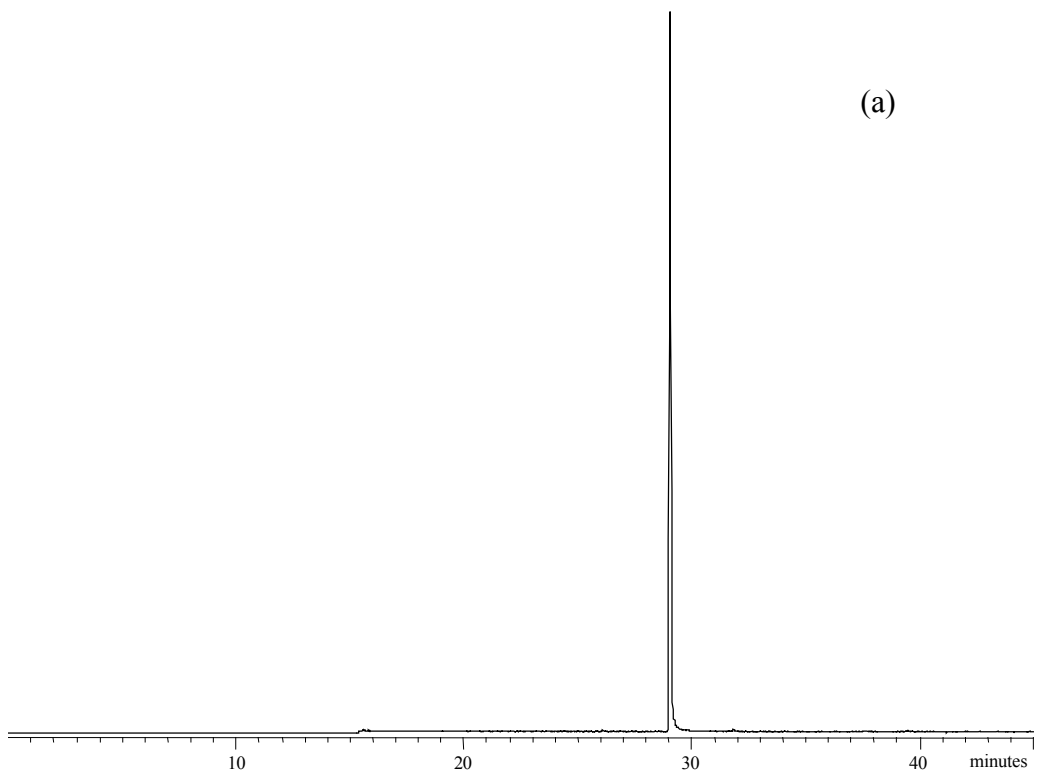
Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

Depuis le début du programme de recherche, une quantité importante de composés à tester a été synthétisée par le Laboratoire de Chimie Organique Synthétique (UMR 7509) de l'Université Louis Pasteur. Cette production a été répartie dans les différents laboratoires partenaires associés au programme de recherche selon le tableau suivant:

Tableau N° 1 : *Quantités (en g) de composés fournis aux différents laboratoires de toxicologie.*

	CNRS	ULP	BFE	Uni KA	Total
2-DCB	0,26	4,8	0,5	0,08	5,64 g
2-dDCB	1,0	-	2,0	2,0	5,00 g
2-tDCB	1,5	8,1	1,5	1,5	12,60 g
2-tDeCB	0,5	3,7	1,76	1,5	7,46 g
γ -stéaro-lactone	0,5	-	1,0	1,0	2,50 g
Total	3,76	16,6	6,76	6,08	33,20 g

Les chromatogrammes et les spectres de masse (preuves de pureté et d'identité) de ces composés, présentés dans les Figures N°8 à 12, témoignent de la pureté élevée (>97%) des produits synthétisés qui peuvent de ce fait également servir d'étalons pour la chromatographie.



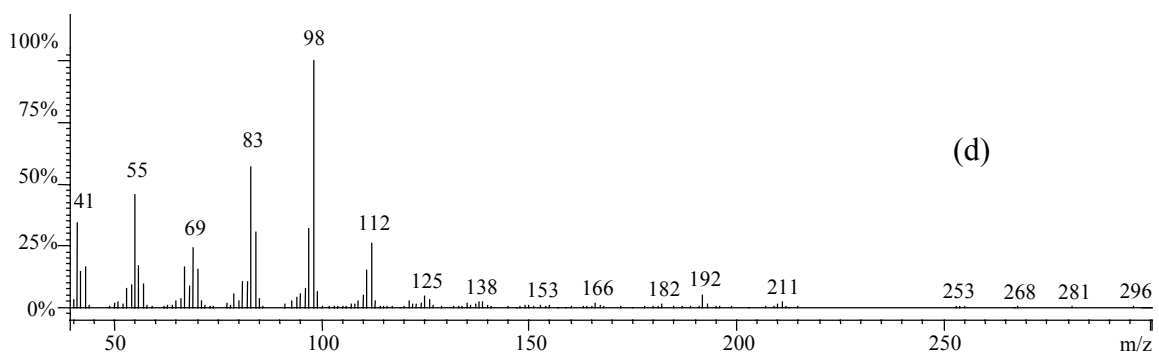
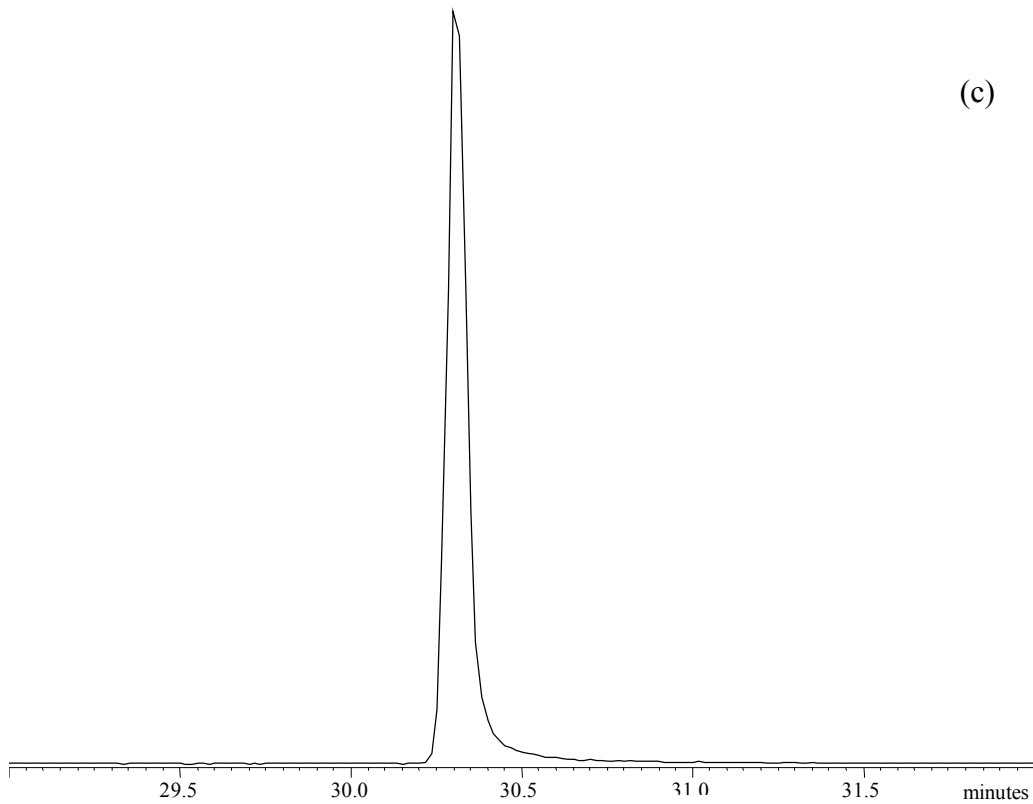
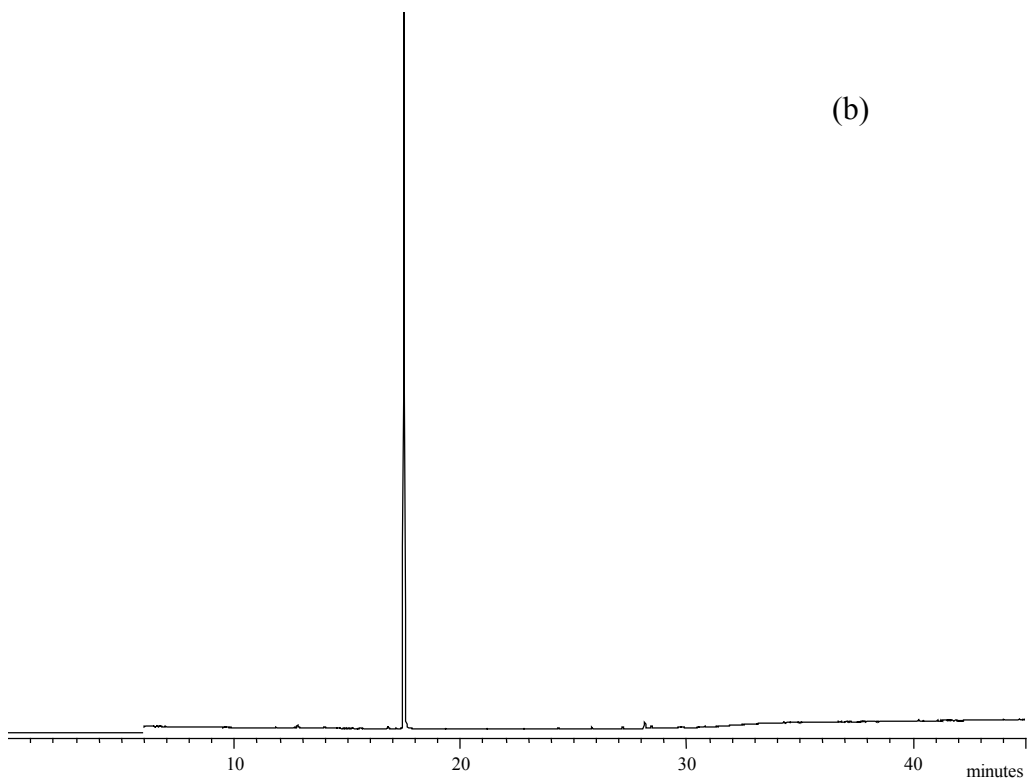
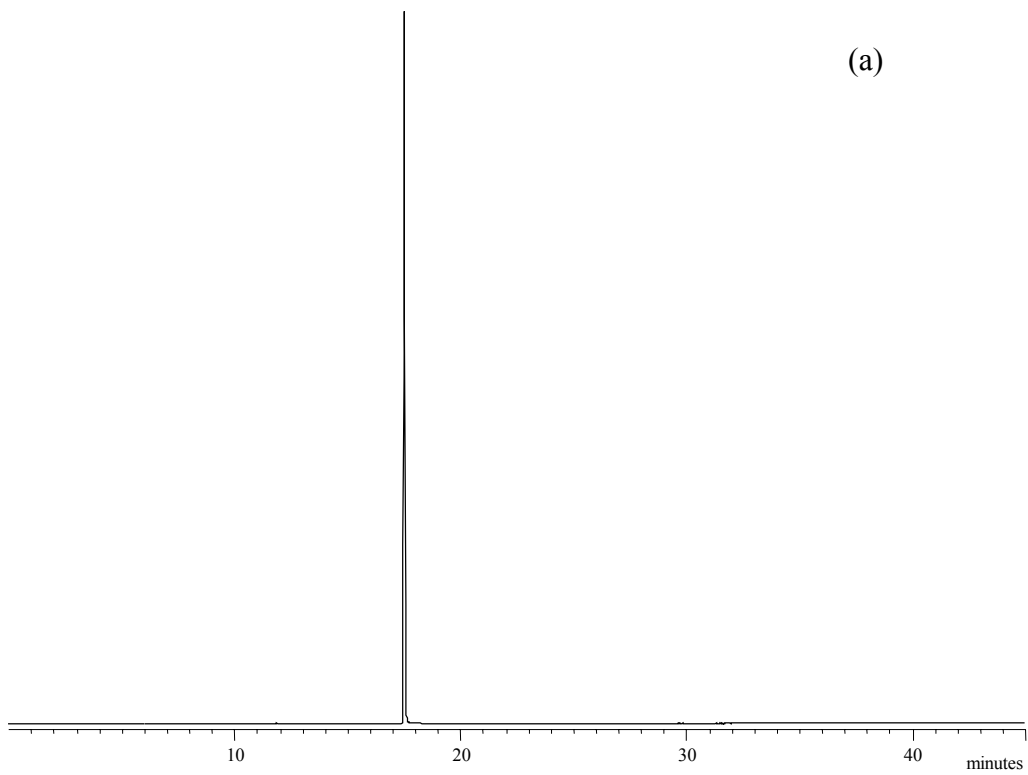


Figure N°8 : Chromatogrammes [$m/z=98$ (a), TIC (b et c)] de la 2-décylcyclobutanone (2-DCB) et son spectre de masse (d).



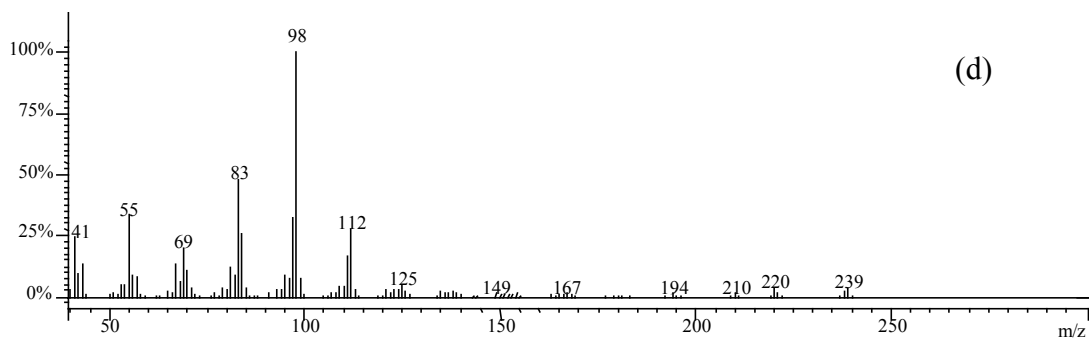
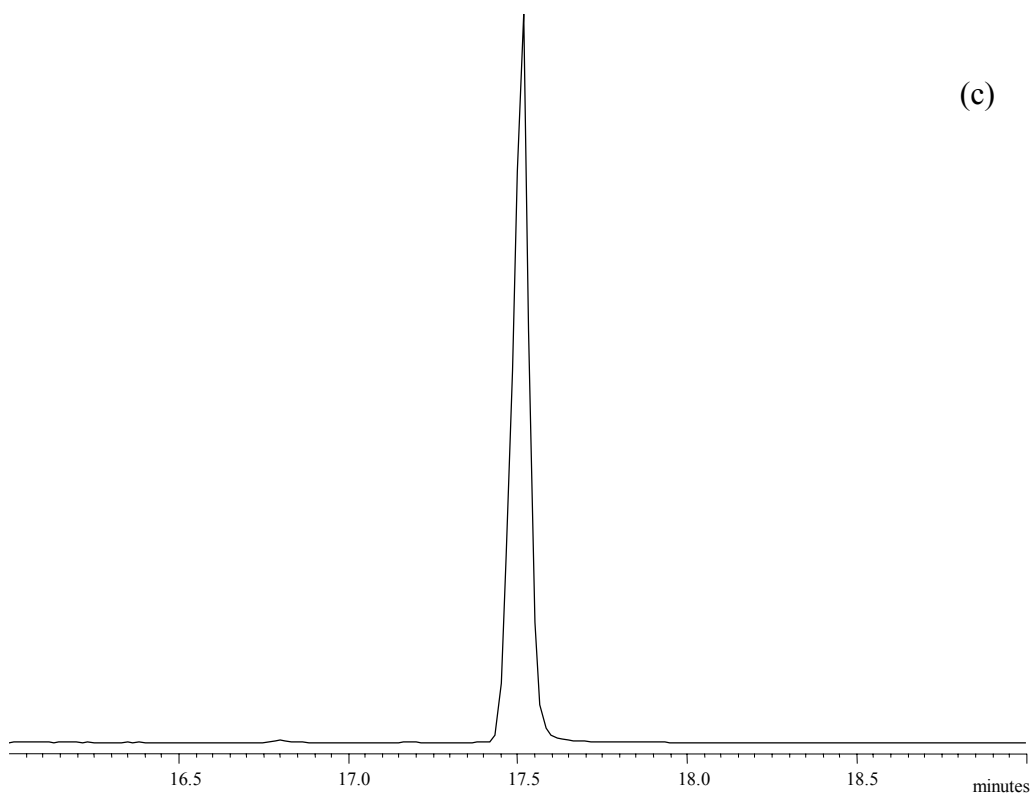
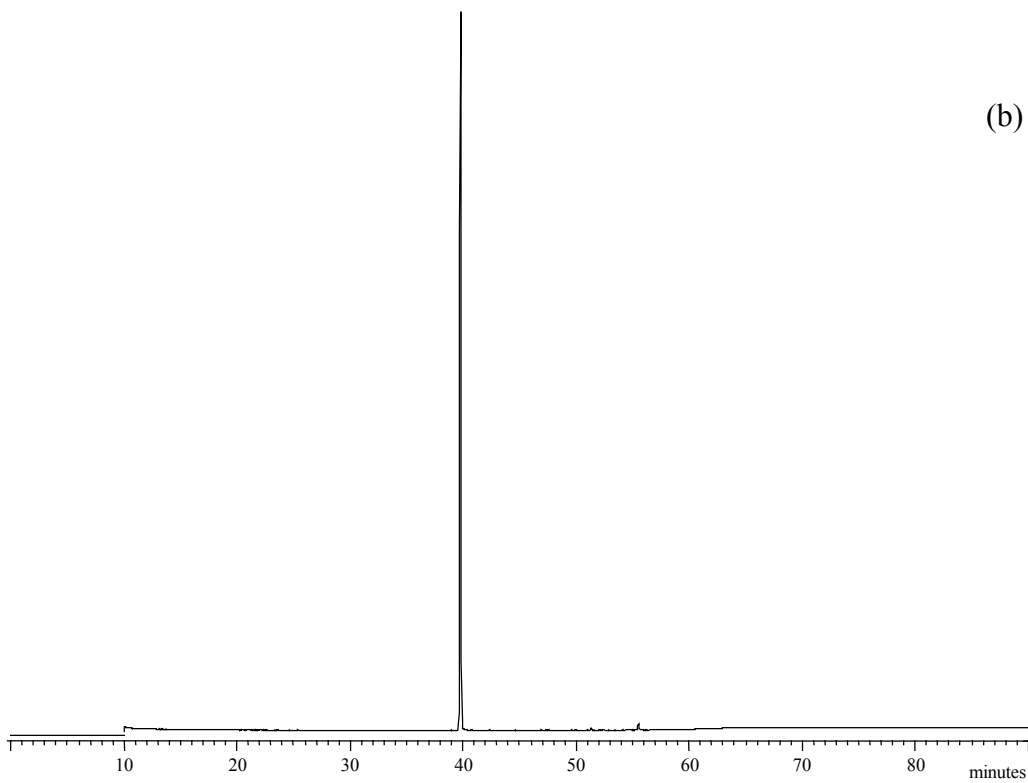
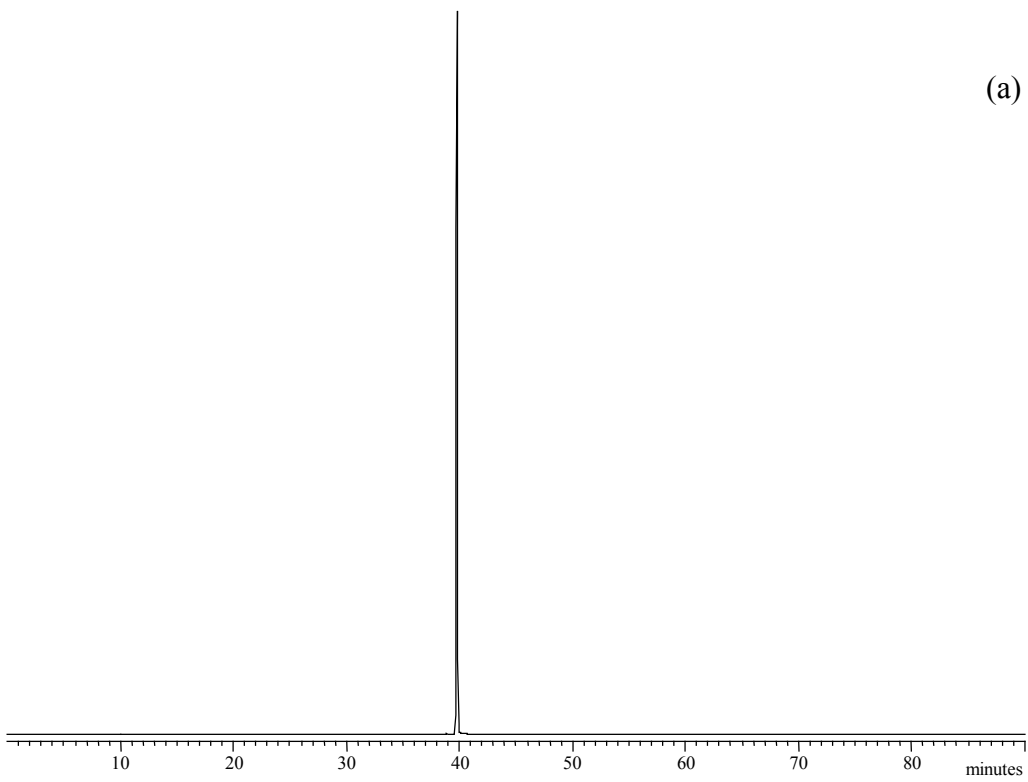


Figure N°9 : Chromatogrammes [$m/z=98$ (a), TIC (b et c)] de la 2-dodécylcyclobutanone (2-dDCB) et son spectre de masse (d).



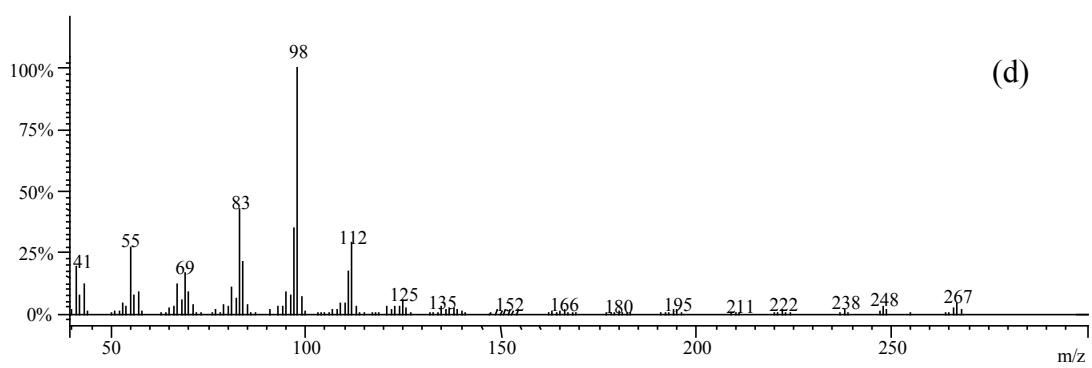
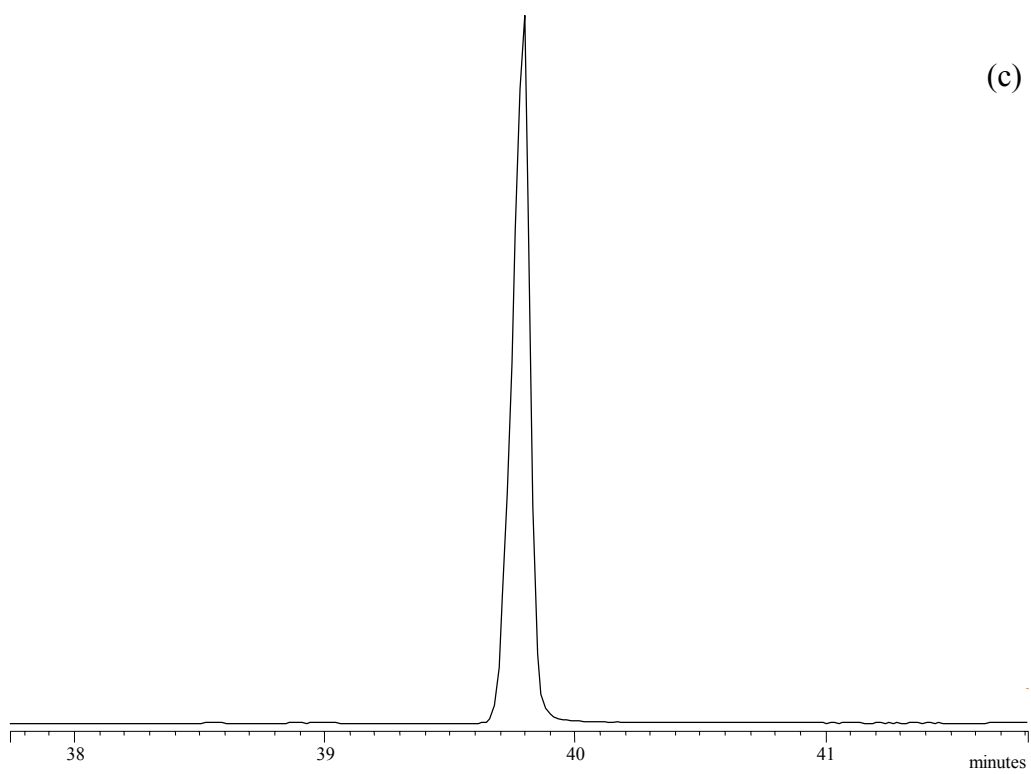
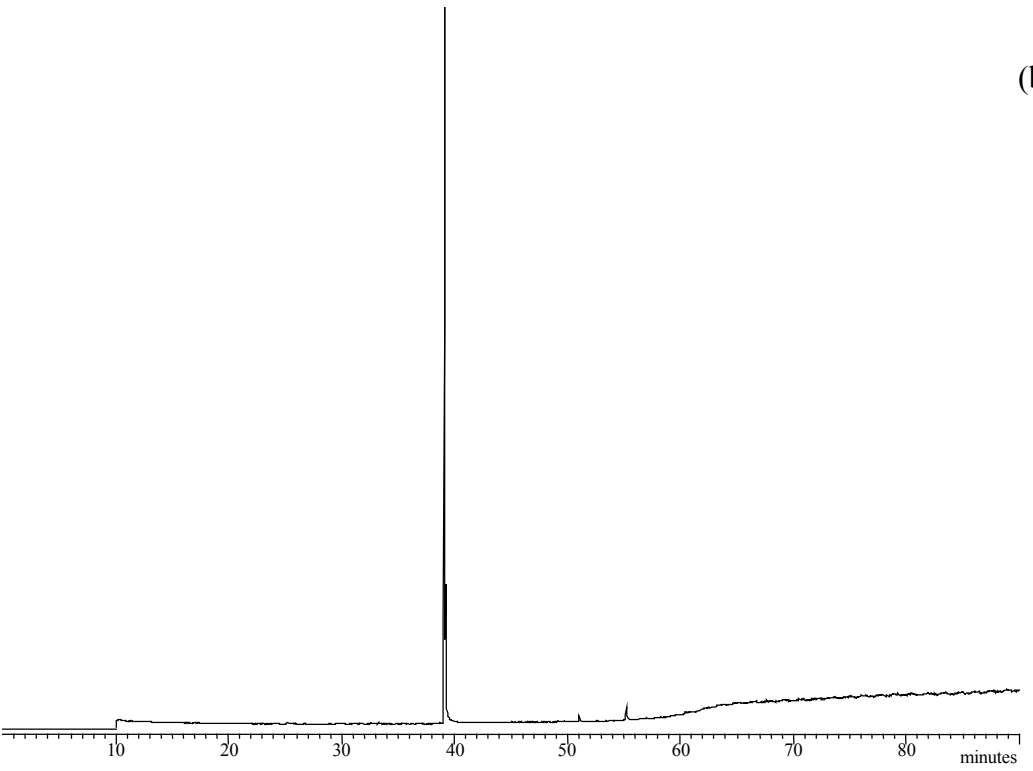
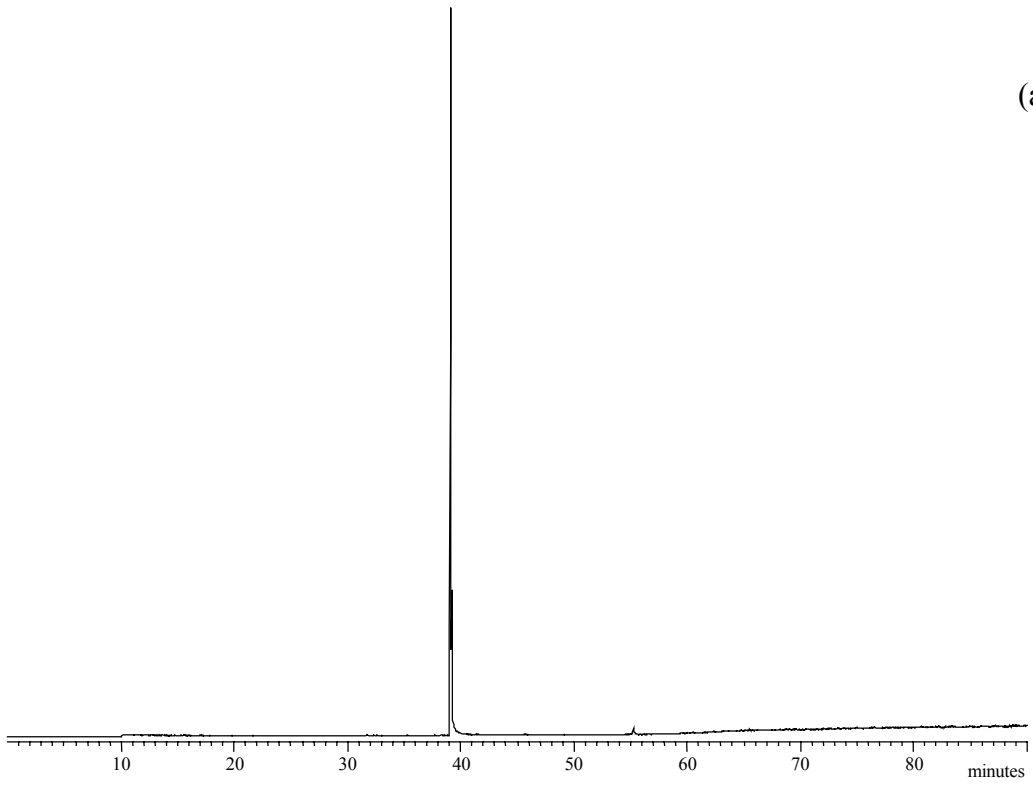


Figure N°10 : Chromatogrammes [$m/z=98$ (a), TIC (b et c)] de la 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB) et son spectre de masse (d).



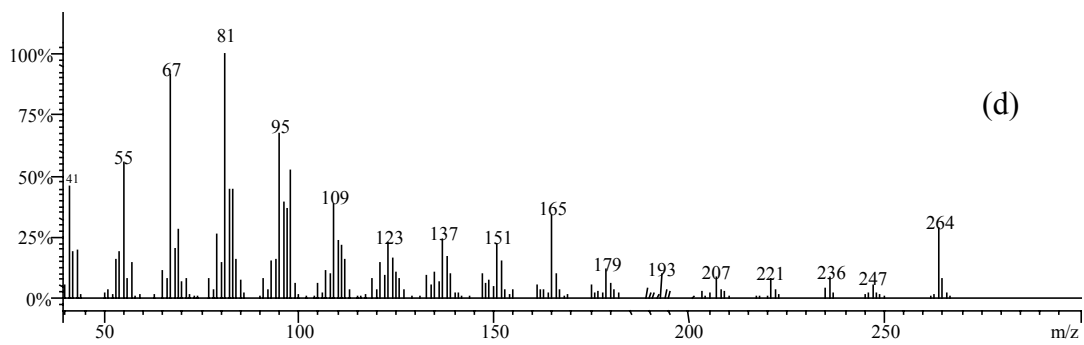
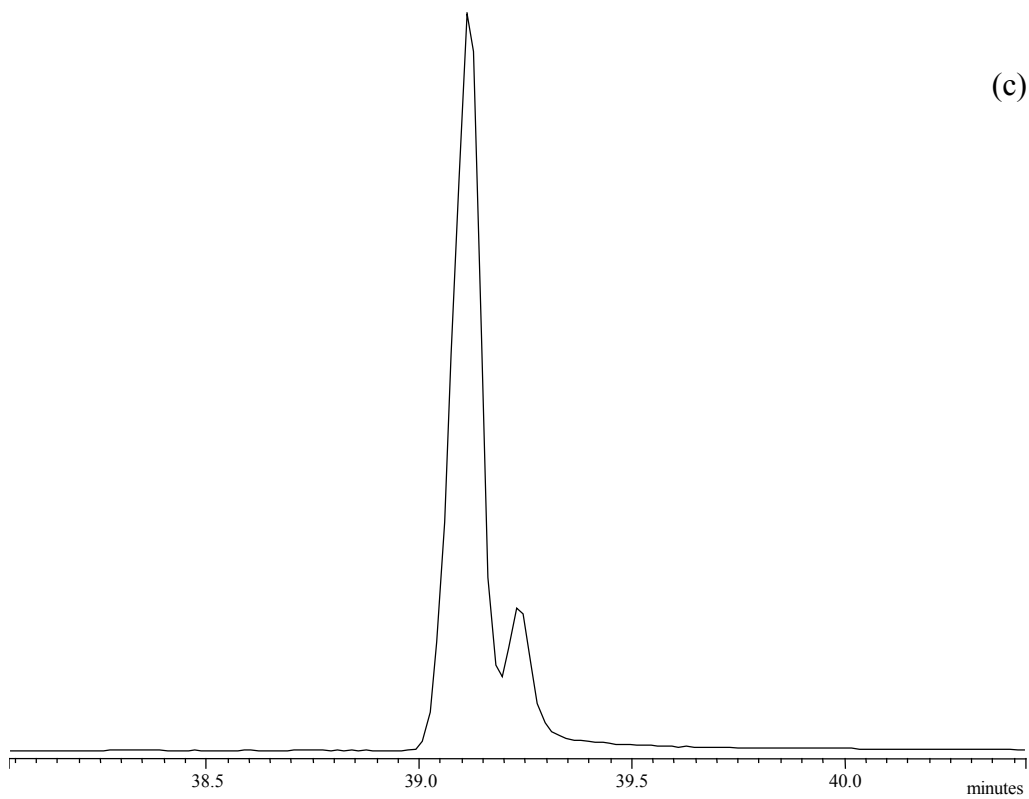
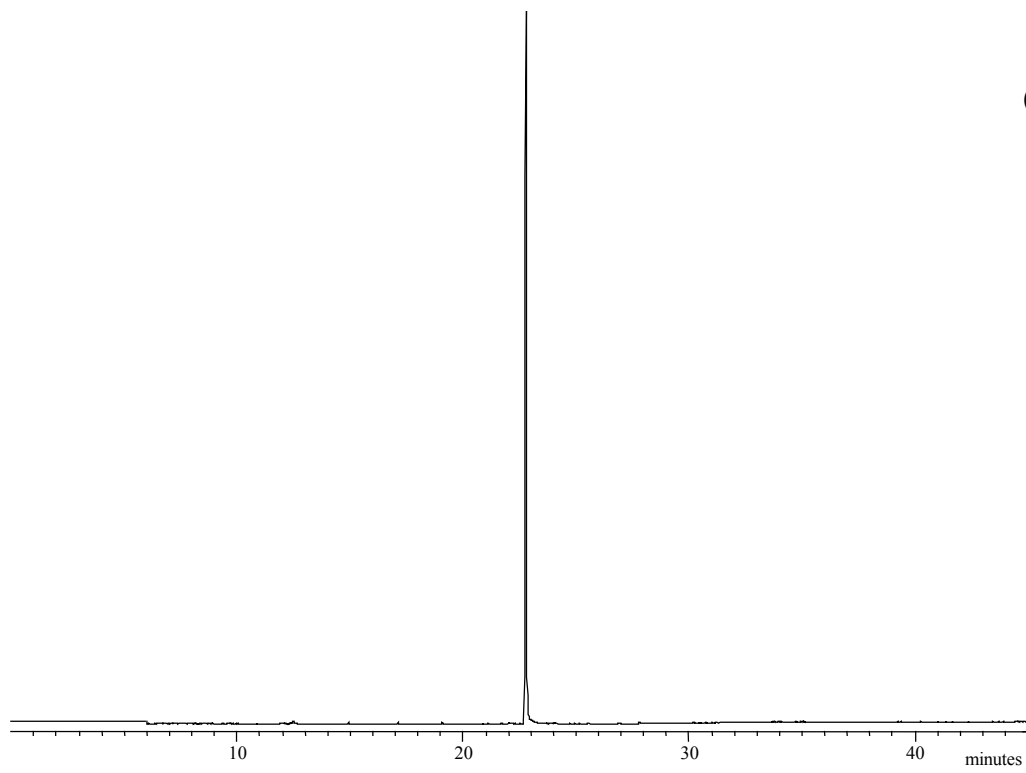
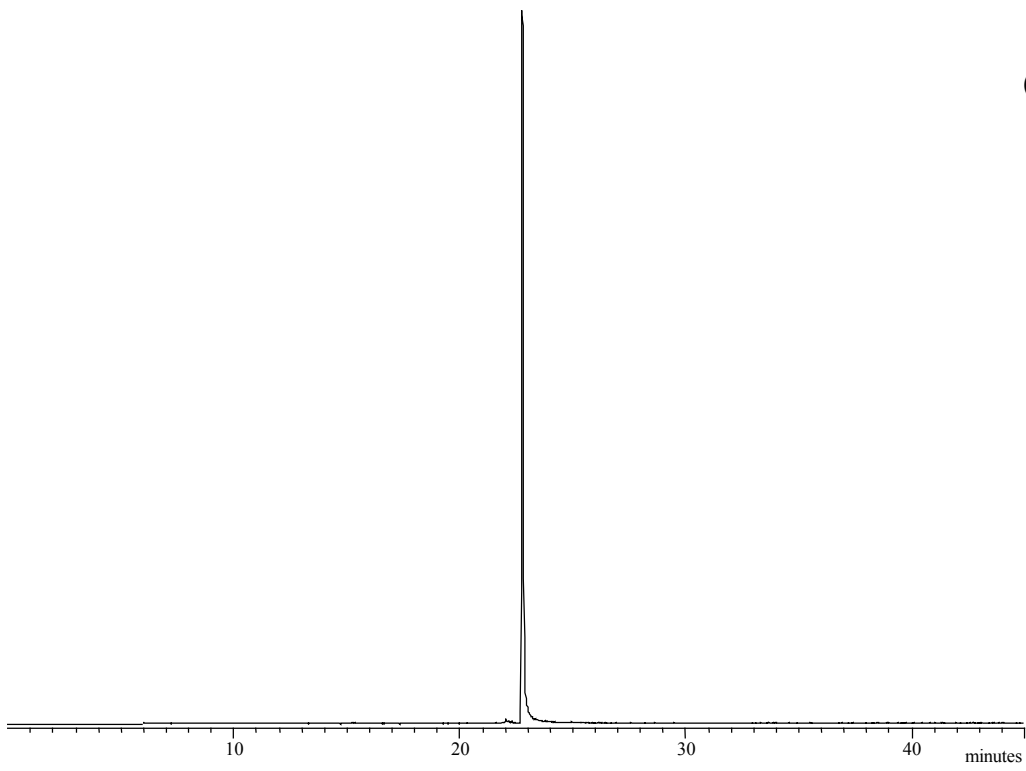


Figure N°11 : *Chromatogrammes [$m/z=98$ (a), TIC (b et c)] de la 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDeCB) et son spectre de masse (d).*



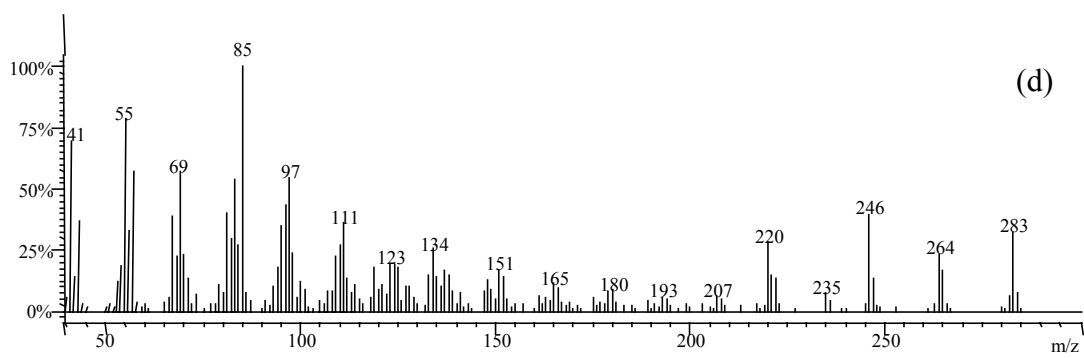
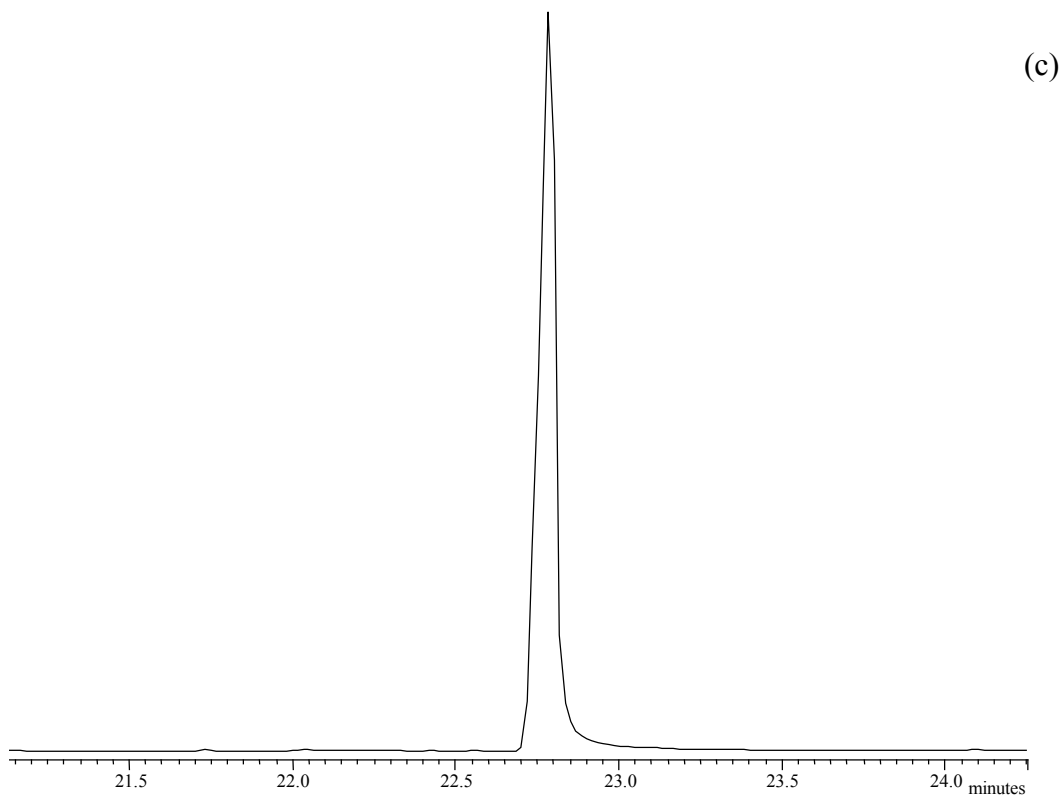


Figure N°12 : Chromatogrammes [$m/z=98$ (a), TIC (b et c)] de la γ -stéarolactone et son spectre de masse (d).

2.5. DETERMINATION DE LA TENEUR EN 2 - ALKYL-CYCLOBUTANONES DANS LES ALIMENTS IONISES.

Eric Marchioni⁽¹⁾, Péter Horvatovich⁽¹⁾ et Dalal Werner⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

⁽²⁾ CRT Aériel

Dans le cadre de ce travail, une série de treize aliments a été étudiée afin de déterminer leur teneur en 2-alkylcyclobutanones radio-induites par les traitements ionisants dans les triglycérides alimentaires. Les teneurs en 2-alkylcyclobutanones et leurs rendements de production ont été calculés pour ces 13 aliments. L'ensemble des chromatogrammes obtenus lors de l'analyse de ces aliments est présenté dans ce rapport (Figures 14 à 26).

MATERIEL ET METHODES

Les produits chimiques

Les étalons de 2-alkylcyclobutanones (2-hexyl-, 2-octyl-, 2-décyl-, 2-undécyl-, 2-undécényl-, 2-dodécyl-, 2-dodécényl, 2-tétradécyl- et 2-tétradécénylcyclobutanones) et le 1,7-hexadécadiène (C16 :2) ont été synthétisés au Laboratoire (UMR 7509). Les esters méthyliques d'acides gras et les triglycérides étalons ont été achetés auprès de la Société Sigma (Saint-Quentin, France). La 2-cyclohexylcyclohexanone était un produit Fluka (Saint Quentin, France). Le Florisil, 60-100/PR mesh (Aldrich, Saint-Quentin, France), a été chauffé à 550°C (5 h) et après refroidissement, désactivé par addition d'eau ultra-pure (20 ml d'eau pour 100 g de Florisil). Le gel de silice 70-230 mesh (Merck, Darmstadt, Allemagne) a été chauffé toute la nuit à 100°C et désactivé par addition d'eau ultrapure dans la proportion de 4 ml d'eau (Milli Q+, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) pour 100 g de gel de silice. Le sulfate de sodium (SDS, Peypin, France), a été chauffé à 650°C (5h) et laissé refroidir dans un dessiccateur avant usage. Le *n*-hexane, de qualité technique, a été distillé en présence d'hydrure de calcium. Le tert-butyl méthyl éther (TBME) était un produit Merck (Darmstadt, Allemagne). L'hydromatrice (Varian, Palo Alto, Californie, USA) a été lavée (6 h d'extraction au Soxhlet à l'hexane) avant utilisation. Le dioxyde de carbone (pureté : 99,9999%, équipé d'un espace de tête d'hélium à 142 bar), a été fourni par la société Air Product and Chemicals (Allentown, Pennsylvanie, USA).

Tous les autres produits chimiques ont été de la plus grande pureté disponible dans le commerce.

Préparation des échantillons alimentaires

Treize aliments de différents types ont été analysés: un produit laitier (le lait en poudre), trois produits végétaux (les noisettes, l'avocat et les fèves de cacao) quatre produits carnés (la chair de poulet, le filet de bœuf, le hamburger et les cuisses de grenouilles), deux produits de la mer (le saumon frais et le saumon fumé) un ovo produit (la coule d'œuf) et deux plats cuisinés (le foie gras et les quenelles de volaille). Tous ces aliments (sauf les quenelles de volaille et la coule d'œuf, fournis par des industries alimentaires françaises) ont été achetés dans un commerce de grande distribution. Ils ont été choisis car ils sont tous susceptibles de faire l'objet d'un traitement ionisant afin d'en assurer la qualité hygiénique (désinsectisation ou destruction de la flore pathogène). Les quenelles de volaille, réalisées par une entreprise française spécialisée dans la confection de plats cuisinés, ont été ionisées à de très fortes doses de rayonnement afin de les stériliser pour pouvoir les conserver à température ambiante pendant de longues périodes. Ce type d'aliment est destiné en priorité aux malades immunodéprimés, aux militaires, aux spationautes et à certains touristes aventuriers désireux d'avoir une bonne autonomie alimentaire.

Pour chaque aliment, 5 échantillons de 200 g environ (3 échantillons de 1 kg pour les cuisses de grenouilles) ont été préparés, placés en présence d'air dans des sachets en matière plastique, thermosoudés et stockés à -20°C jusqu'au jour de leur traitement par rayonnements ionisants.

Les traitements ionisants et la dosimétrie

Un accélérateur d'électron de type Van de Graaff, 2,2 MeV, 75 μA (Vivirad High Voltage, Handschuheim, France) situé au Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologies Aériales (Schiltigheim, France) a été utilisé afin de réaliser les traitements ionisants. Les doses de rayonnement absorbées (1, 3, 5, 10, 30, 50 et 100 kGy) ont été contrôlées à l'aide de dosimètres Radiachromic FWT 60.00 (Far West Technology, Goleta, Californie, USA), préalablement calibrés à l'aide de dosimètres à l'alanine (Laboratoire National Henri Becquerel, Gif-sur-Yvette, France). Un dépôt uniforme de la dose absorbée $\pm 10\%$ à l'intérieur du produit a été obtenu en plaçant sur l'aliment un fin diffuseur de cuivre (100 μm) (Kuntz *et al.*, 1991). Au cours des traitements ionisants, les échantillons alimentaires étaient à la température de $6-8^{\circ}\text{C}$, seuls les quenelles de volaille étaient maintenues à -80°C (dans de la carboglace et de l'éthanol) afin de pouvoir les ioniser à des doses de traitement très élevées sans en dégrader les qualités organoleptiques.

Dans le cas des cuisses de grenouilles, une pré-étude a été nécessaire afin de déterminer la valeur de la dose qui avait été absorbée par cet aliment avant son achat dans le commerce. En effet, Les échantillons de cuisses de grenouille disponibles sur le marché français sont presque tous traités par les rayonnements ionisants à des doses de l'ordre de 5 kGy afin de supprimer tout risque dû à la contamination de cet aliment par les *Salmonelles*.

Les échantillons alimentaires étudiés ont été achetés dans un commerce de grande distribution et portaient sur l'étiquetage, la mention « traités par les rayonnements ionisants ». La véracité de cette allégation a été vérifiée par spectroscopie de RPE selon le protocole EN 1786 (Anon., 1996a). La valeur de la dose absorbée a été déterminée par la méthode des ajouts dosés de doses de rayonnement (3, 5 et 10 kGy) et mesure du signal par RPE sur les os secs extraits des cuisses de grenouille ionisées à des doses croissantes (Figure 13a).

Le signal par RPE des radicaux radio induits dans les os des cuisses de grenouilles augmente de façon linéaire avec la valeur de la dose absorbée (Figure 13b). Il a dès lors été possible de déterminer la valeur initiale de la dose absorbée par le produit commercial. Cette dose a été évaluée à une valeur de 6,3 kGy. Afin de déterminer les taux de production, les cuisses de grenouille ont été ionisées à des doses supplémentaires de 5 et 10 kGy.

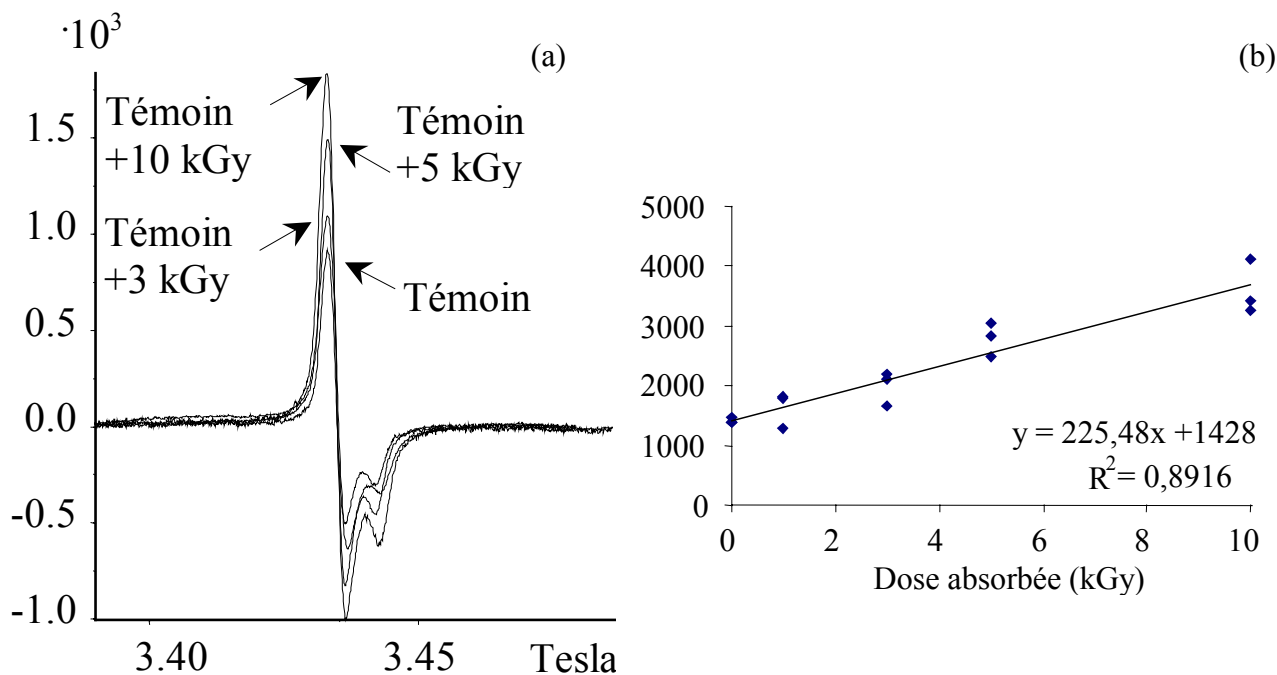


Figure 13: Signaux de RPE (a) enregistrés à partir d'os extraits de cuisses de grenouilles re-ionisées à des doses supplémentaires égales à 0, 3, 5 et 10 kGy et régression linéaire (b) permettant de déterminer la valeur de la dose absorbée par cet aliment.

Extraction et purification de la matière grasse

L'extraction (au *n*-hexane) et la quantification de la matière grasse d'un aliment, ainsi que l'analyse des 2-alkylcyclobutanones contenues dans la matière grasse ont été réalisées selon le protocole CEN (Anon., 1996b) modifié par l'addition aux 200 mg de matières grasses de 200 μ l d'un mélange de 2-undécyl- et de 2-undécényl-cyclobutanone ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) juste avant la chromatographie sur Florisil. Chaque analyse a été réalisée en *triplicate*. Deux de ces aliments (avocat et coule d'œuf) ont été analysés grâce au protocole d'extraction par le dioxyde de carbone en phase supercritique proposé par Horvatovich *et al.* (2000).

Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés selon la norme ISO (Anon., 1978). Ils ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Varian 3300, Sunnyvale, USA) équipé d'une colonne capillaire FFAP [25 m, 0,20 mm de diamètre interne, contenant une phase stationnaire de 0,33 μm d'épaisseur (Hewlett-Packard, Geneva, Suisse)] et d'un détecteur à ionisation de flamme (250°C). Les conditions d'analyse étaient les suivantes : injecteur 230°C ; programme de température de la colonne: 70°C (2 min) suivi d'une augmentation de $15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ jusqu'à 230°C , température finale maintenue pendant 10 min; volume d'échantillon injecté, 1 μ l; mode d'injection splitless; gaz vecteur, N_2 , $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

La séparation chromatographique des 2-alkylcyclobutanones a été réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian (type 3400) équipé d'un injecteur SPI réfrigéré et d'un détecteur de masse (Saturn 2000, Varian) fonctionnant en mode d'ionisation par impact électronique. Les spectres de masse ont été enregistrés entre 50 et 300 m/z. Le chromatographe en phase gazeuse était équipé d'une colonne capillaire ZB-5-MS (Zebron, Torrance, Californie, USA), 30 m, 0,25 mm de diamètre interne, contenant une phase stationnaire de 0,10 μm d'épaisseur (5% diphényl-95% diméthylpolysiloxane) ou d'une colonne analytique capillaire OV-20-MS (Ohio Valley, Marietta, Ohio, USA), 60 m, 0,25 mm de diamètre interne, contenant une phase stationnaire d'épaisseur 0,10 μm (20% diphényl-80% diméthylpolysiloxane). Lors de l'utilisation de la colonne capillaire ZB5 MS, les extraits ont été préalablement purifiés à l'aide d'une résine échangeuse de cations imprégnée d'ions argent, selon le protocole proposé par Ndiaye *et al.* (1999a). Dans ce cas, l'étalon interne utilisé était le 1,7-hexadécadiène. La température initiale de l'injecteur était de 50°C (maintenue pendant 0,1 min) et a été augmentée à la vitesse de 230°C·min⁻¹ jusqu'à une valeur de 240°C, température finale maintenue constante jusqu'à la fin du programme de température de la colonne : 60°C (maintenu pendant 2 min) suivi d'une augmentation de 8°C·min⁻¹ ou 4°C·min⁻¹ (ZB-5-MS ou OV-20-MS respectivement) jusqu'à une température de 300°C, température finale maintenue pendant 15 min. Le volume d'échantillon injecté était de 1 μl . Le gaz vecteur (débit de 1 ml·min⁻¹) était de l'hélium (pureté 99,9995%, Air Liquide).

Les 2-alkylcyclobutanones ont été quantifiées selon le chromatogramme reconstruit de l'ion m/z=98 (2-hexyl-, 2-octyl-, 2-décyl-, 2-undécyl-, 2-dodécyl- et 2-tétradécylcyclobutanones) ou de la somme des ions m/z=98+95 (2-dodécényl- et 2-tétradécénylcyclobutanones).

RESULTATS ET DISCUSSION

Au cours de cette étude, aucune des 2-alkylcyclobutanones recherchées [2-hexylcyclobutanone (2-HCB), 2-octylcyclobutanone (2-OCB), 2-décylcyclobutanone (2-DCB), 2-dodécylcyclobutanone (2-dDCB), 2-dodécénylcyclobutanone (2-dDeCB), 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB)] et 2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB) n'a pu être détectée dans les aliments non ionisés. Ce résultat confirme l'hypothèse avancée par Crone *et al.* (1992a, 1993) concernant le caractère URP des 2-alkylcyclobutanones. Cependant, il semble plus prudent aujourd'hui de se limiter à affirmer que les quantités de 2-alkylcyclobutanones éventuellement présentes dans les aliments non ionisés sont toujours inférieures à la limite de détection de la méthode d'analyse utilisée.

Le protocole CEN a seulement été validé pour l'étude des 2-dDCB et 2-tDCB (Anon., 1996). Il a été démontré qu'il pouvait également être appliqué à l'analyse des 2-HCB, 2-OCB, 2-DCB, 2-dDeCB et 2-tDeCB (Figure N°14). Les taux de recouvrement des 2-alkylcyclobutanones ont été évalués avec divers aliments. Bien que toujours proches de 100% pour les 2-tDCB (97-98%) et 2-dDCB (95-97%), ils diminuaient avec le raccourcissement de la chaîne alkyle (90-92% pour la 2-DCB, 77-79% pour la 2-OCB et 69-73% pour la 2-HCB), très probablement à cause de la volatilité de ces molécules. Bien entendu, les résultats des analyses ont été corrigés en fonction de ces valeurs des taux de recouvrement.

Les concentrations des différentes 2-alkylcyclobutanones formées, en fonction de la valeur de la dose absorbée sont liées par une relation linéaire (le coefficient de corrélation R² est toujours compris entre 0,87 et 0,99 sauf dans le cas de la 2-décylcyclobutanone dans la chair de poulet et cela certainement à cause de la faible concentration en acide gras myristique précurseur).

L'existence de cette relation linéaire qui a déjà été présentée par Crone *et al.* (1992a et b) et Stevenson *et al.* (1993) en ce qui concerne la formation de 2-dDCB dans la viande de poulet,

permet de déterminer un taux de formation des différentes 2-alkylcyclobutanones produites dans chaque aliment par radiolyse de leurs acides gras précurseurs.

Tableau N°2: Taux de production des 2-alkylcyclobutanones ($\mu\text{g/g}$ matière grasse/kGy) dans différents aliments.

Aliments	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB
Lait en poudre	0,112	0,393	0,338	0,021	0,250
Noisettes	–	0,132	0,043	–	1,357
Poulet	0,006	0,342	0,118	0,072	0,806
Filet de bœuf	0,037	0,767	0,649	0,090	1,350
Foie gras	0,017	0,883	0,794	0,047	1,853
Fèves de cacao	–	1,243	3,353	–	0,233
Hamburger	0,026	0,409	0,355	0,031	0,501
Saumon fumé	0,048	1,181	0,060	0,052	0,167
Cuisses de grenouilles	0,021	0,175	0,086	–	0,039
Quenelles de volaille	0,009	0,159	0,267	0,007	0,173
Saumon	0,045	0,142	0,026	0,083	0,199
Avocats	–	0,740	–	–	0,444
Coule d'œuf	–	0,159	0,083	0,014	0,255

Etant donné que les acides gras les plus abondants sont les acides palmitique, stéarique et oléique et, dans une moindre importance, les acides myristique et palmitoléique, les 2-alkylcyclobutanones les plus intéressantes pour étudier les propriétés toxicologiques des aliments seront bien entendu les 2-DCB, 2-dDCB, 2-tDCB, 2-dDeCB et 2-tDeCB. Les taux de production de ces composés, lorsqu'ils sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière grasse/kGy sont présentés dans le tableau N°2. Ils sont en accord avec ceux qui ont été publiés par Stevenson *et al.* (1990, 1993 et 1996), Boyd *et al.* (1991), Crone *et al.* (1992 a, b et 1993) qui ont établi que le taux de production de la 2-dDCB dans la chair de poulet reste toujours compris entre 0,3 et 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{kGy}^{-1}$. La quantité de chaque 2-alkylcyclobutanone ne dépend donc que de la dose absorbée et de la quantité d'acide gras précurseur. Les faibles taux de production de la 2-DCB sont dus à la faible concentration de l'acide myristique précurseur de cette 2-ACB. Le tableau N°3 présente les rendements de formation des 2-alkylcyclobutanones lorsqu'ils sont exprimés en $\text{nmol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ d'acide gras précurseur $\cdot\text{kGy}^{-1}$. Ils sont en accord avec ceux qui ont été reportés par Ndiaye *et al.* (1999b) [un peu plus importants dans le cas des noisettes (2-dDCB et 2-tDCB), du lait en poudre et de la chair de poulet (2-tDCB)], qui avait établi que les taux de production des 2-alkylcyclobutanones saturées était toujours compris entre 1,0 et 1,6 $\text{nmol}/\text{mmol}/\text{kGy}$ et qu'ils ne dépendaient ni de la matrice de l'aliment étudié ni de la longueur de la chaîne alkyle de la 2-alkylcyclobutanone considérée. Les valeurs des taux de production inférieurs à 1 sont dues à la faible quantité des acides gras précurseurs (myristique pour tous les aliments, sauf le saumon et le lait en poudre, palmitique dans le cas des quenelles de volaille et du saumon fumé, palmitoléique dans le cas du Hamburger, du saumon fumé, des quenelles de volaille et de la coule d'œuf et oléique dans le cas des fèves de cacao, du saumon fumé, des cuisses de grenouilles et de la coule d'œuf) qui conduit inévitablement à de grandes erreurs de dosage des très faibles concentrations en 2-ACB dans les aliments ionisés.

Cependant aucune raison qui puisse expliquer le très important taux de production de la 2-tDCB dans les échantillons de hamburger et des 2-dDCB et 2-tDCB dans les fèves de cacao n'a pu être trouvée. Seul un ajout de 15% (m :m) de matières grasses dans les hamburgers et la très forte teneur en antioxydants (polyphénols) dans les fèves de cacao peut permettre de différencier ces aliments des autres qui ont été étudiés dans ce rapport. Stevenson (1994) avait déjà observé un rendement de production trop important de la 2-tDCB par rapport à celui de la

2-dDCB lors de l'analyse des 2-ACB formées dans de la viande de porc ionisée. Cet auteur avait proposé que l'action des rayonnements ionisants sur la molécule de triglycéride se fasse de façon privilégiée sur les acides gras situés en position 1 et 3 sur le glycérol. La position des acides gras stéarique palmitique et oléique serait alors un paramètre important à considérer pour évaluer avec précision la concentration en 2-ACB dans les aliments ionisés.

Tableau N°3: Taux de production des 2-alkylcyclobutanones (nmol/mmol d'acide gras précurseur/kGy) dans différents aliments.

<i>Aliments</i>	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB
Lait en poudre	1,31	1,65	2,79	1,34	1,16
Noisettes	–	2,44	2,74	–	1,80
Poulet	–	1,88	2,32	1,41	1,65
Filet de bœuf	0,70	1,33	1,67	1,09	1,59
Foie gras	–	1,39	1,93	–	1,08
Fèves de cacao	–	6,14	12,21	–	0,71
Hamburger	0,43	1,87	4,18	0,48	1,17
Saumon fumé	0,63	0,76	1,11	0,48	0,56
Cuisses de grenouilles	–	1,05	1,23	–	0,20
Quenelles de volaille	0,34	0,71	1,42	0,31	0,52
Saumon	1,03	1,30	1,20	1,31	1,21
Avocats	–	1,70	–	–	1,00
Coule d'œuf	–	1,20	1,80	0,60	0,70

L'ensemble des chromatogrammes de tous les échantillons alimentaires ionisés dans le cadre de ce programme sont présentés dans les Figures N°14 à 26.

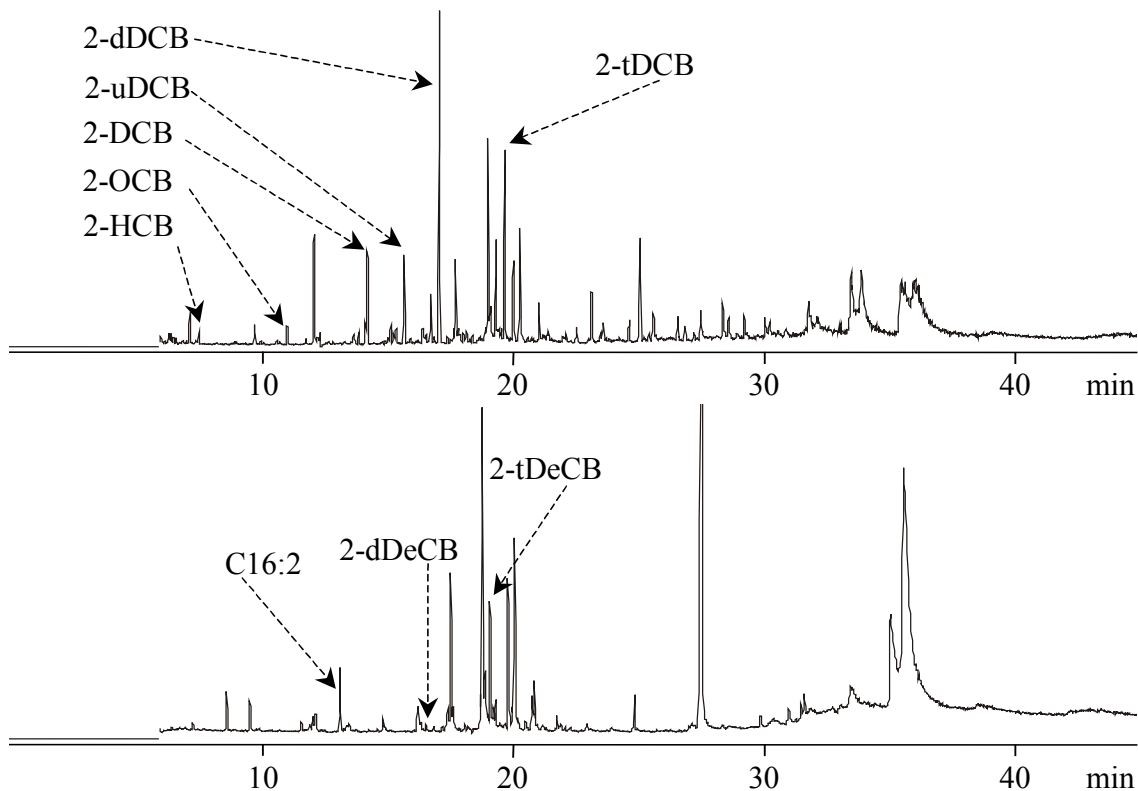


Figure N°14 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de lait ionisé à 5,0 kGy. (colonne ZB5 de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

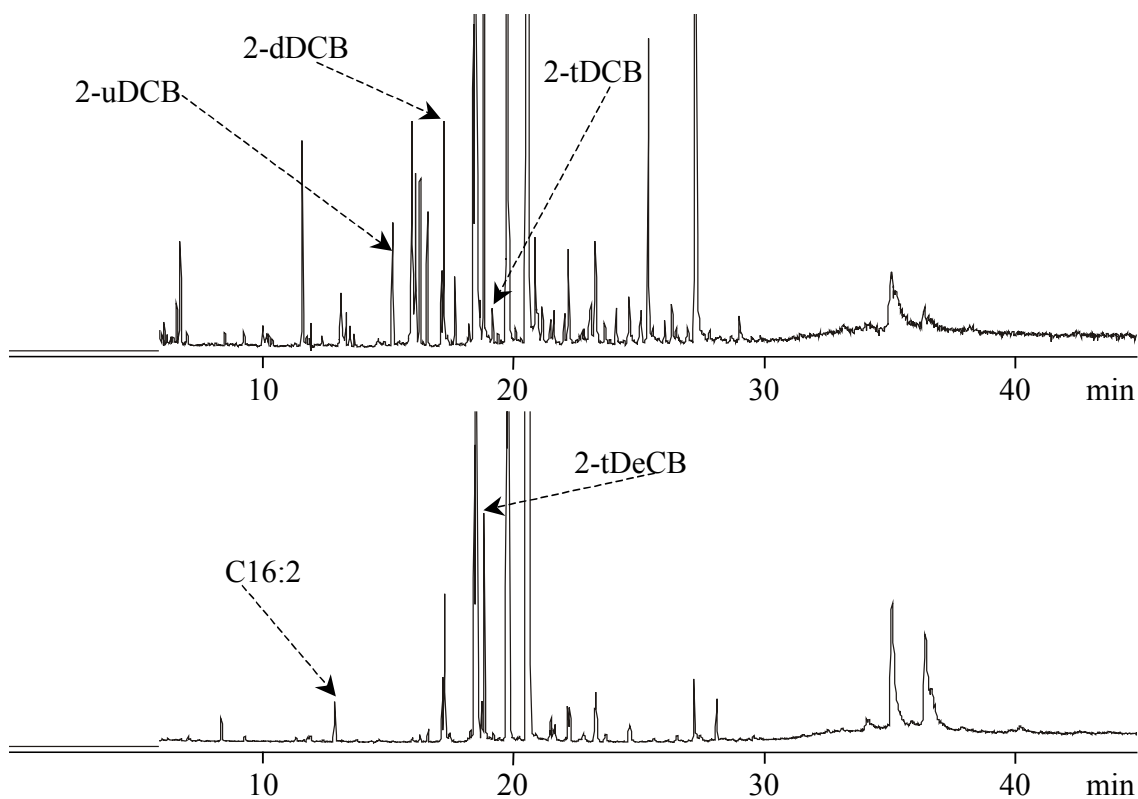


Figure N°15 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de noisettes ionisé à 5,0 kGy (colonne ZB5 de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

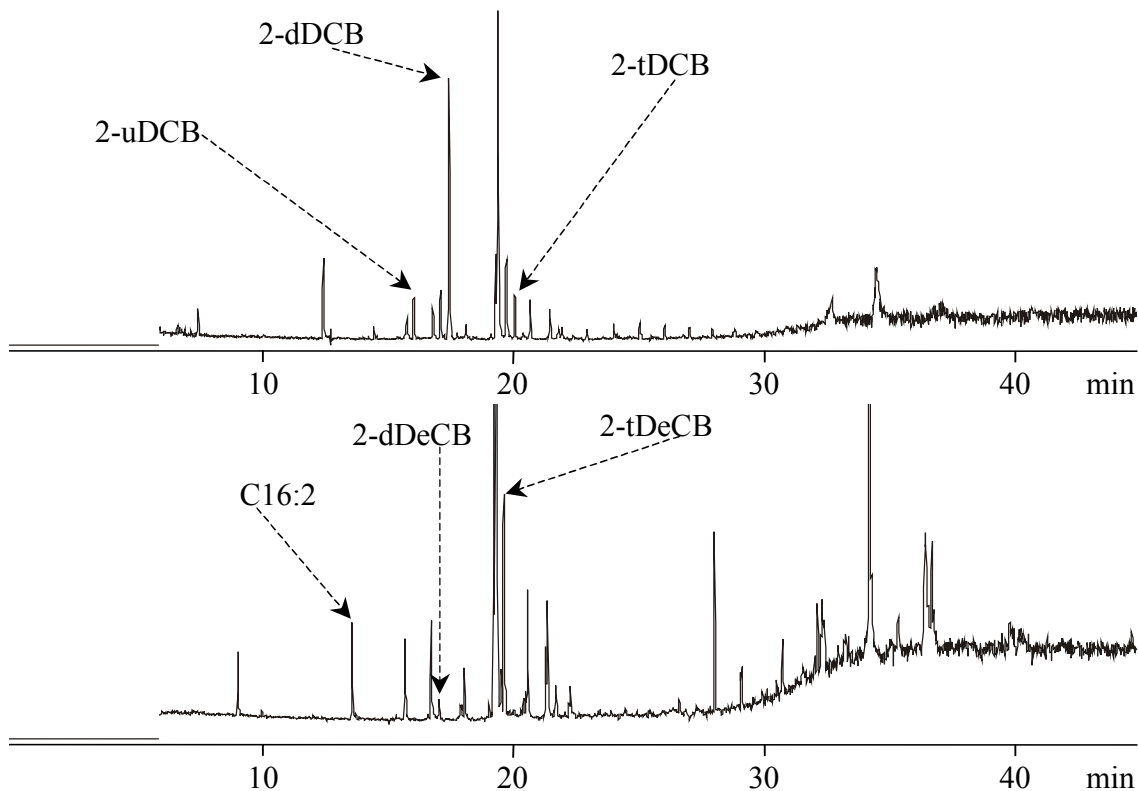


Figure N°16 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de poulet ionisé à 5,0 kGy (colonne ZB5 de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

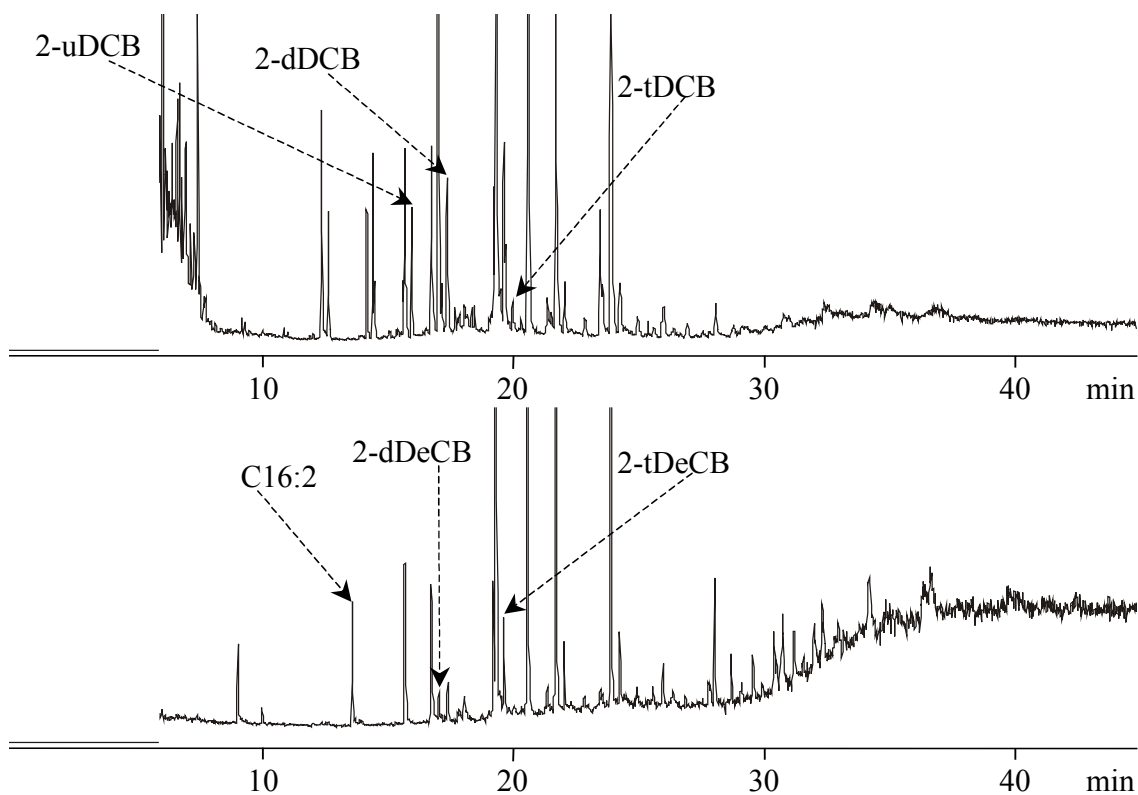


Figure N°17 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de saumon ionisé à 5,0 kGy (colonne ZB5 de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

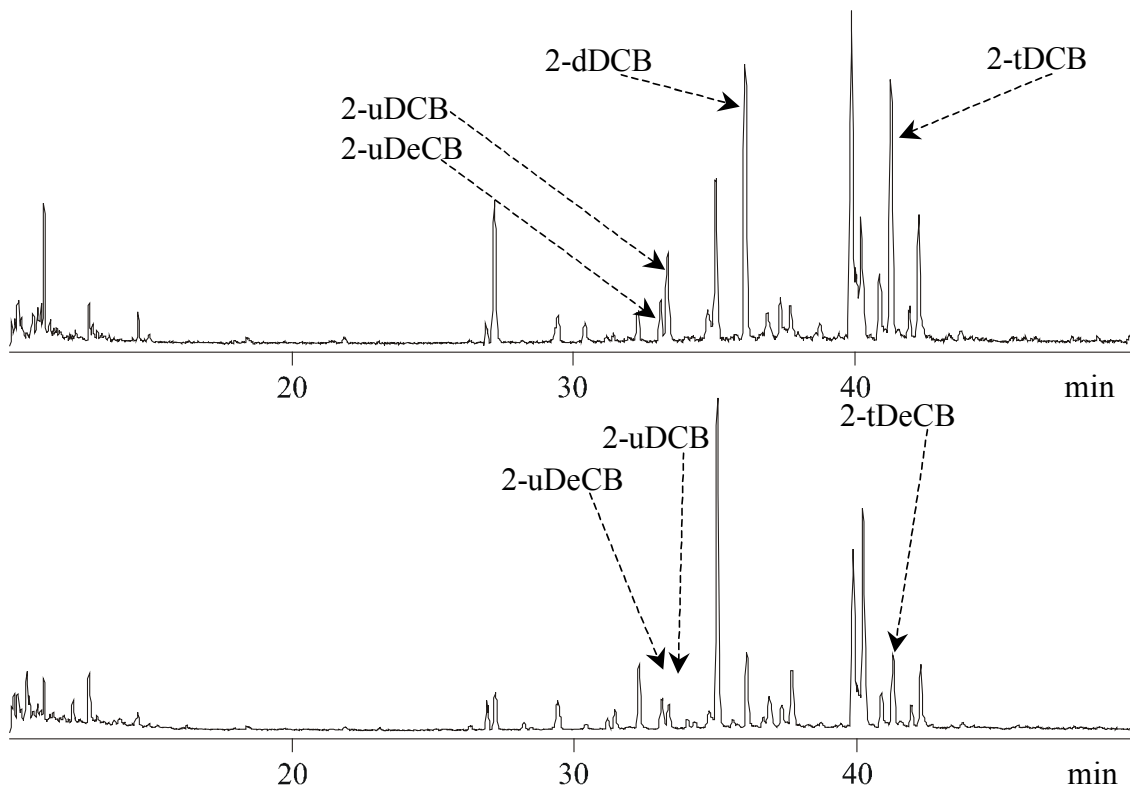


Figure N°18 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de hamburger ionisé à 5,0 kGy.

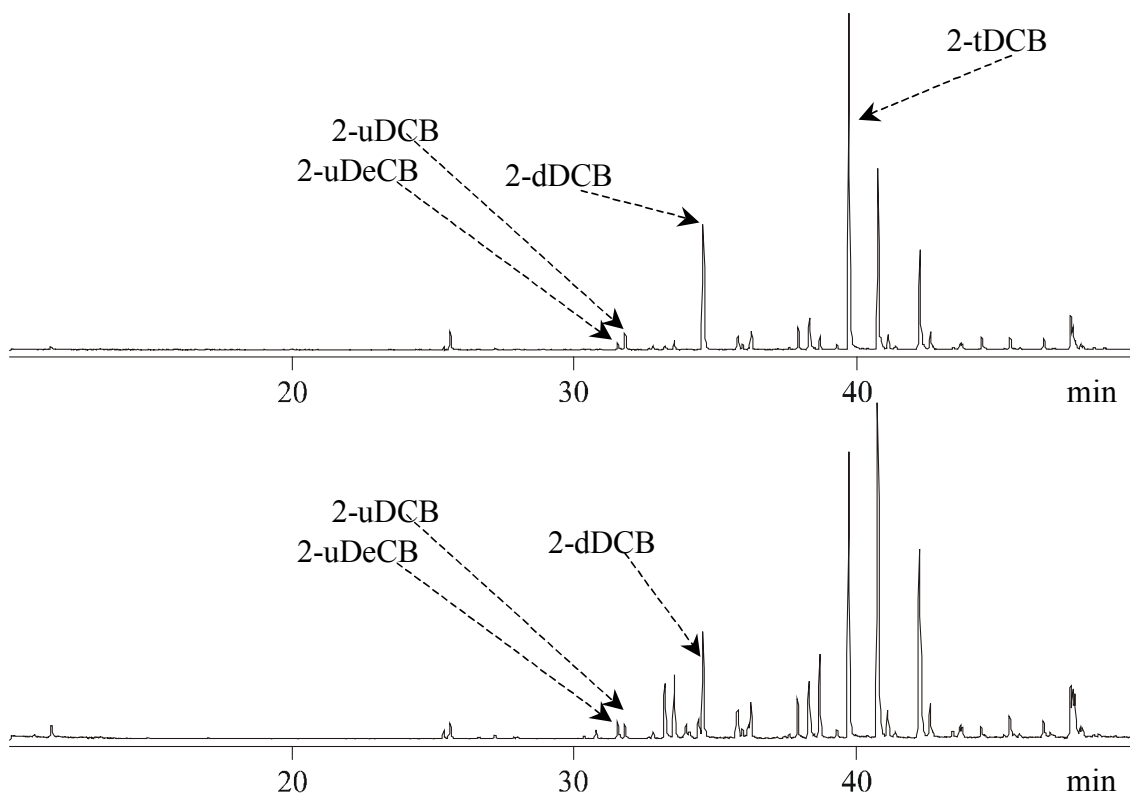


Figure N°19 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de fèves de cacao ionisé à 5,0 kGy.

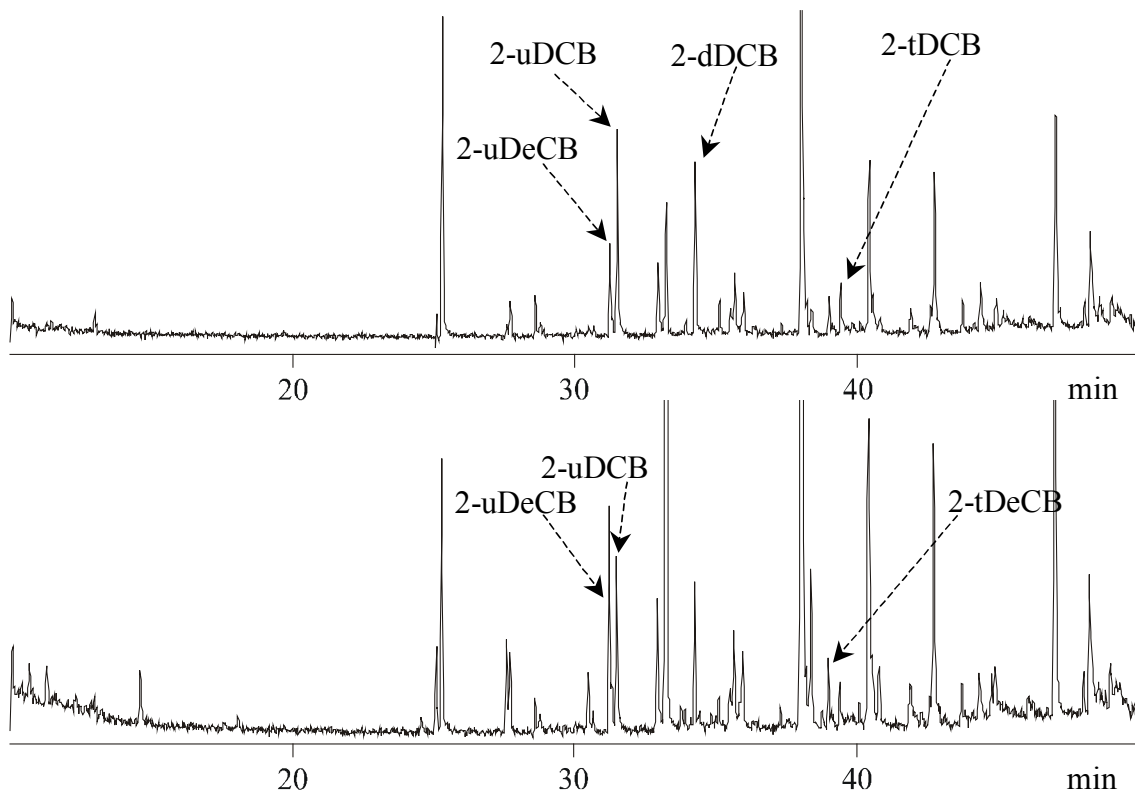


Figure N°20 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de saumon fumé ionisé à 5,0 kGy.

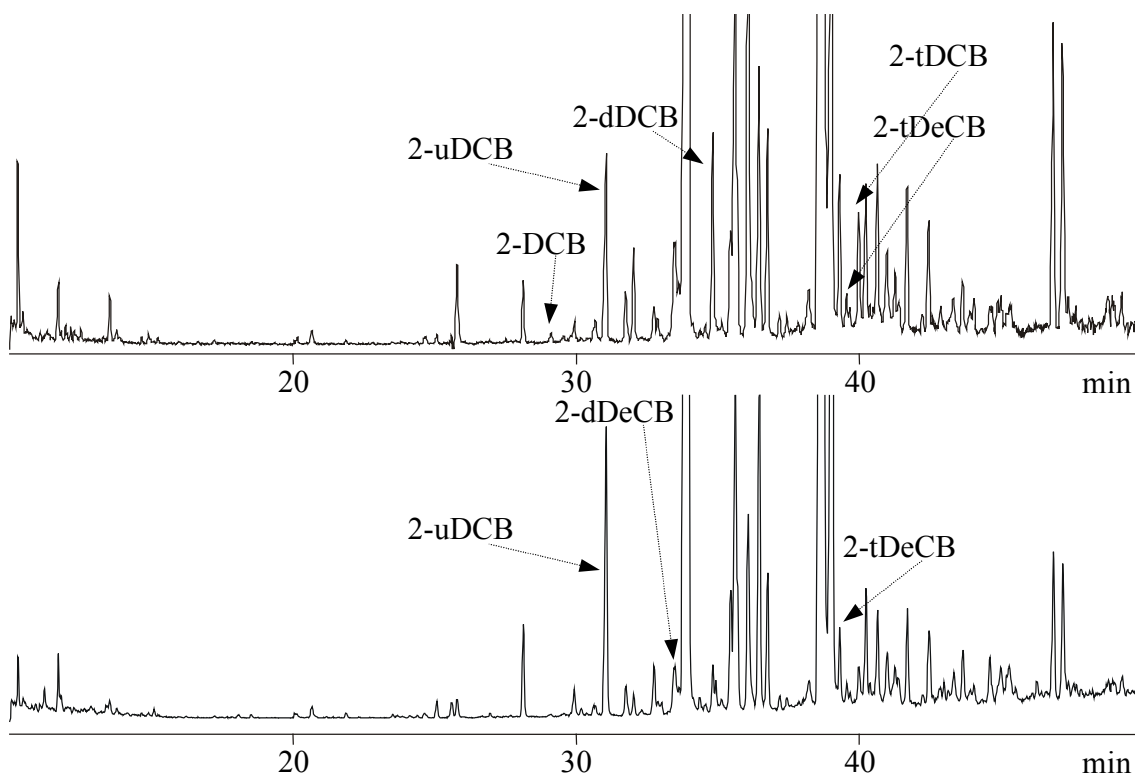


Figure N°21 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de cuisses de grenouilles ionisé à 6,3 kGy.

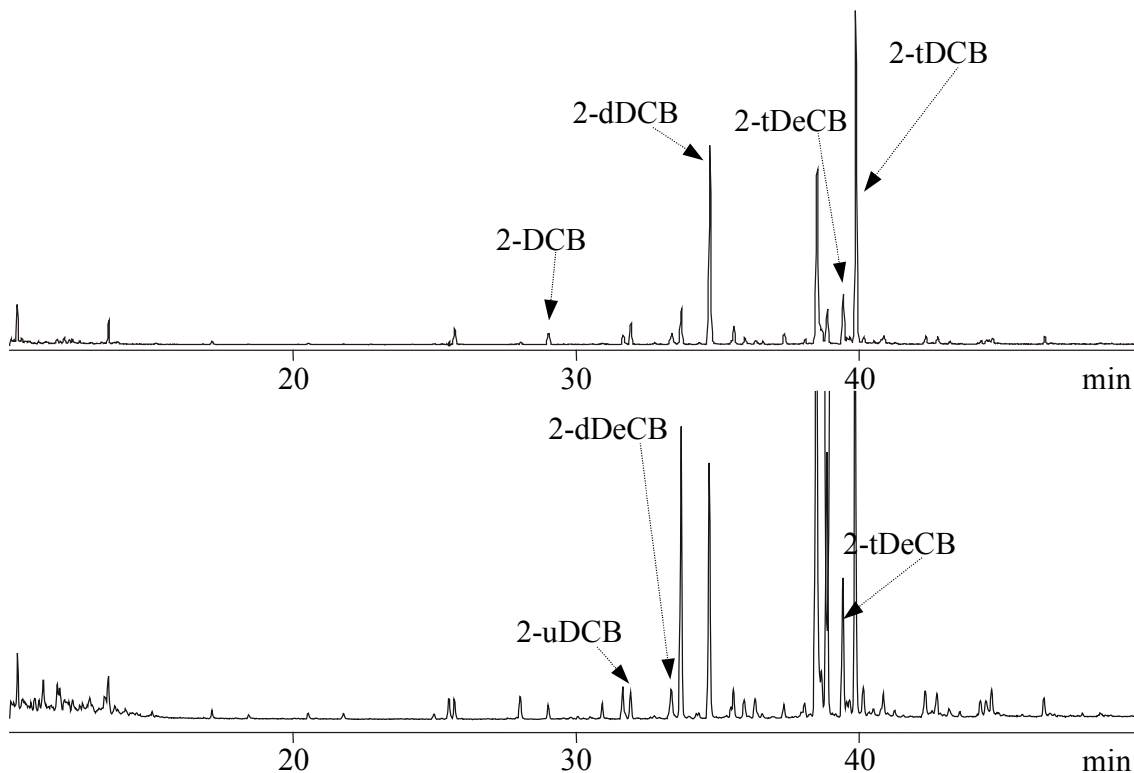


Figure N°22 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de quenelles de volaille ionisé à 50,0 kGy.

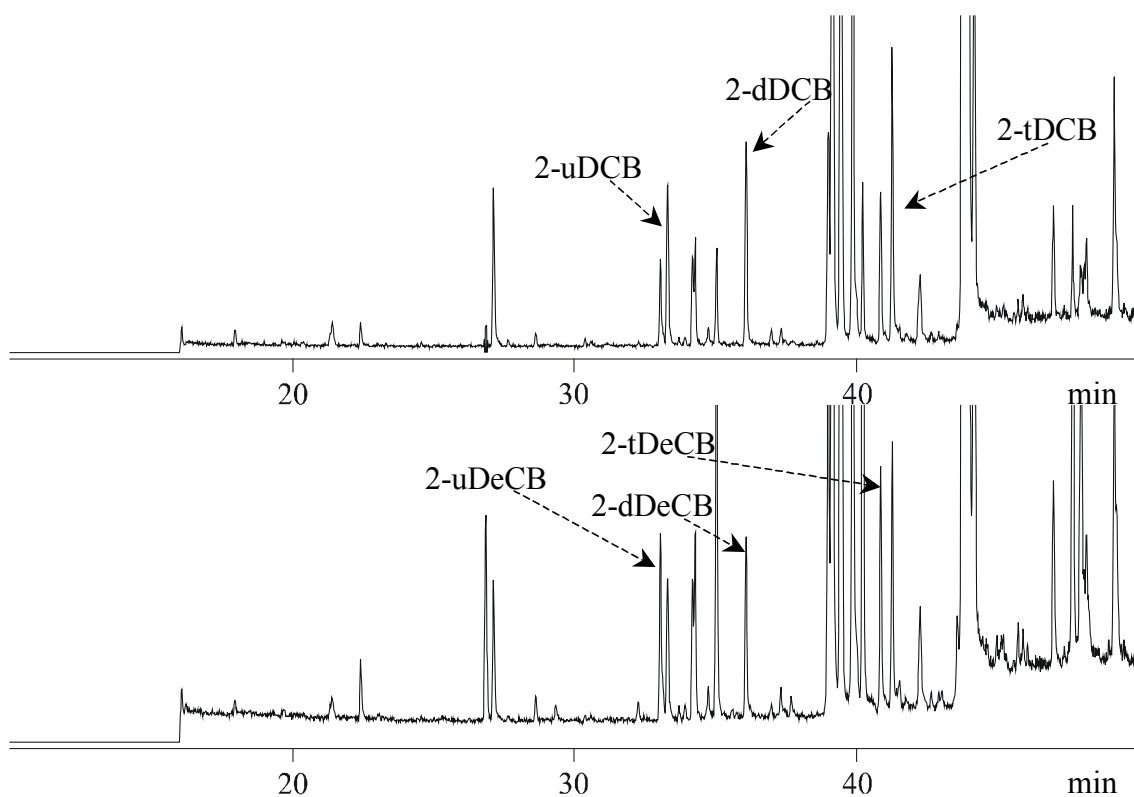


Figure N°23 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de foie gras ionisé à 5,0 kGy.

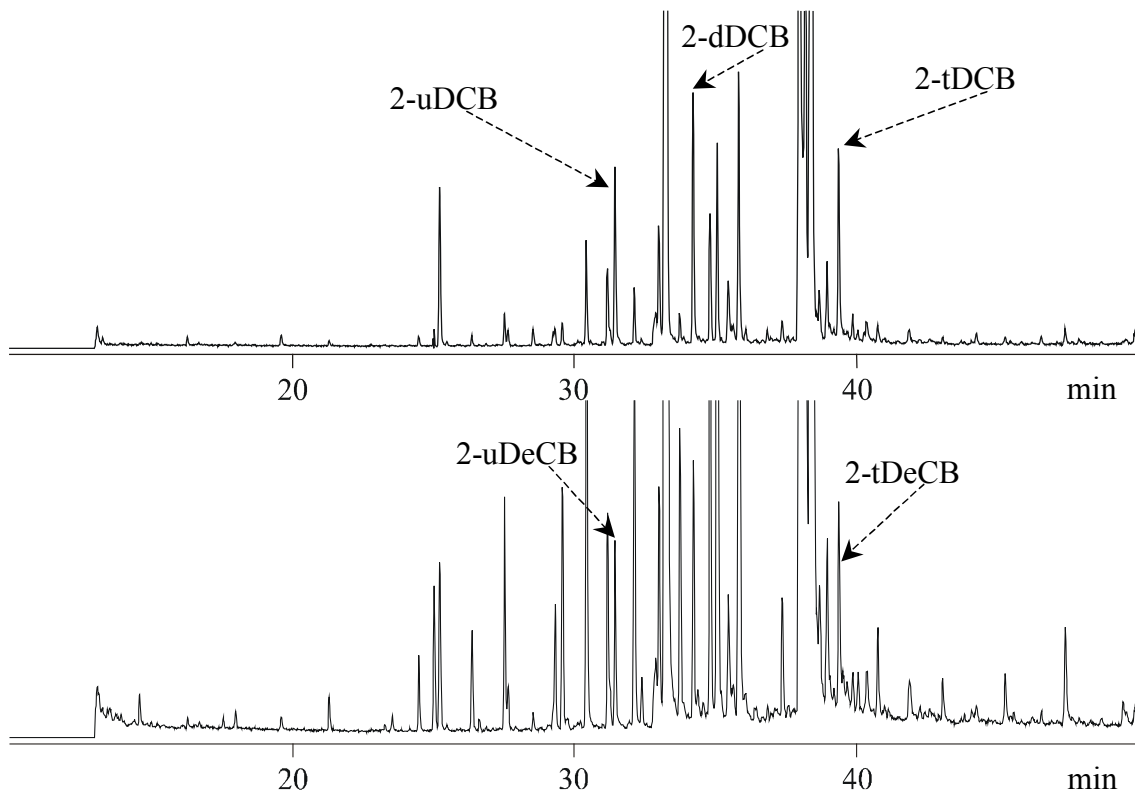


Figure N°24 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon de filet de bœuf ionisé à 5,0 kGy.

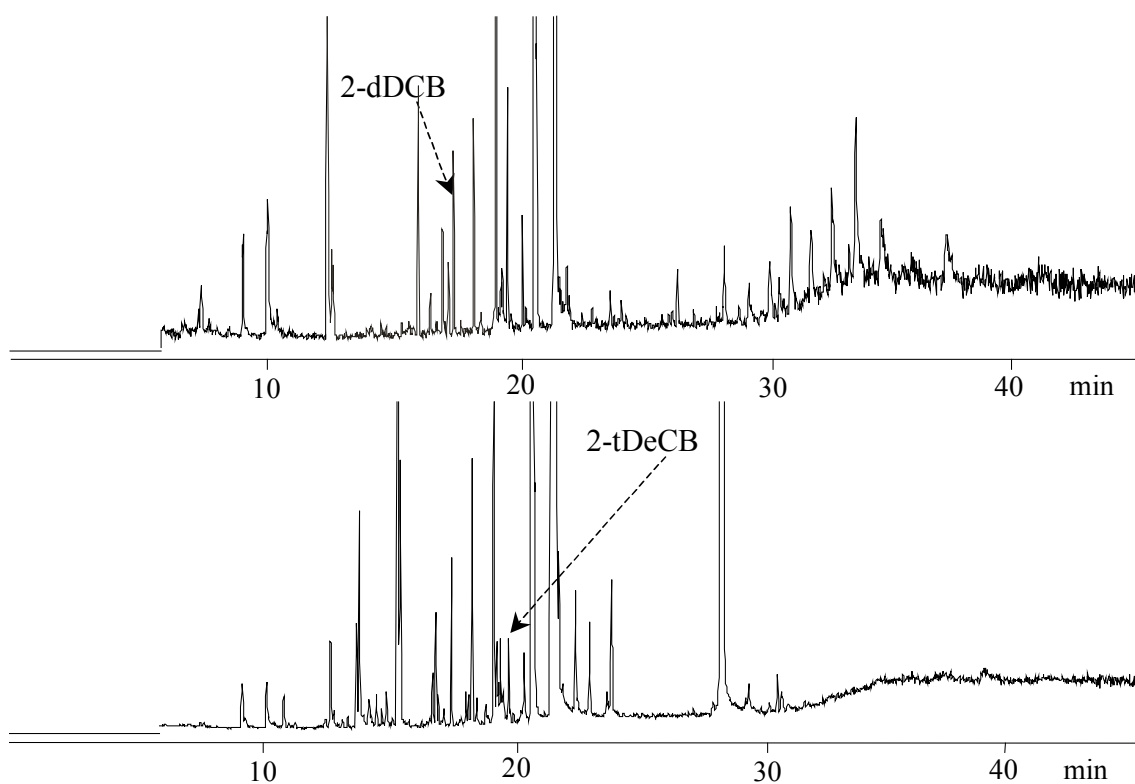


Figure N°25 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon d'avocat ionisé à 1,0 kGy (colonne de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

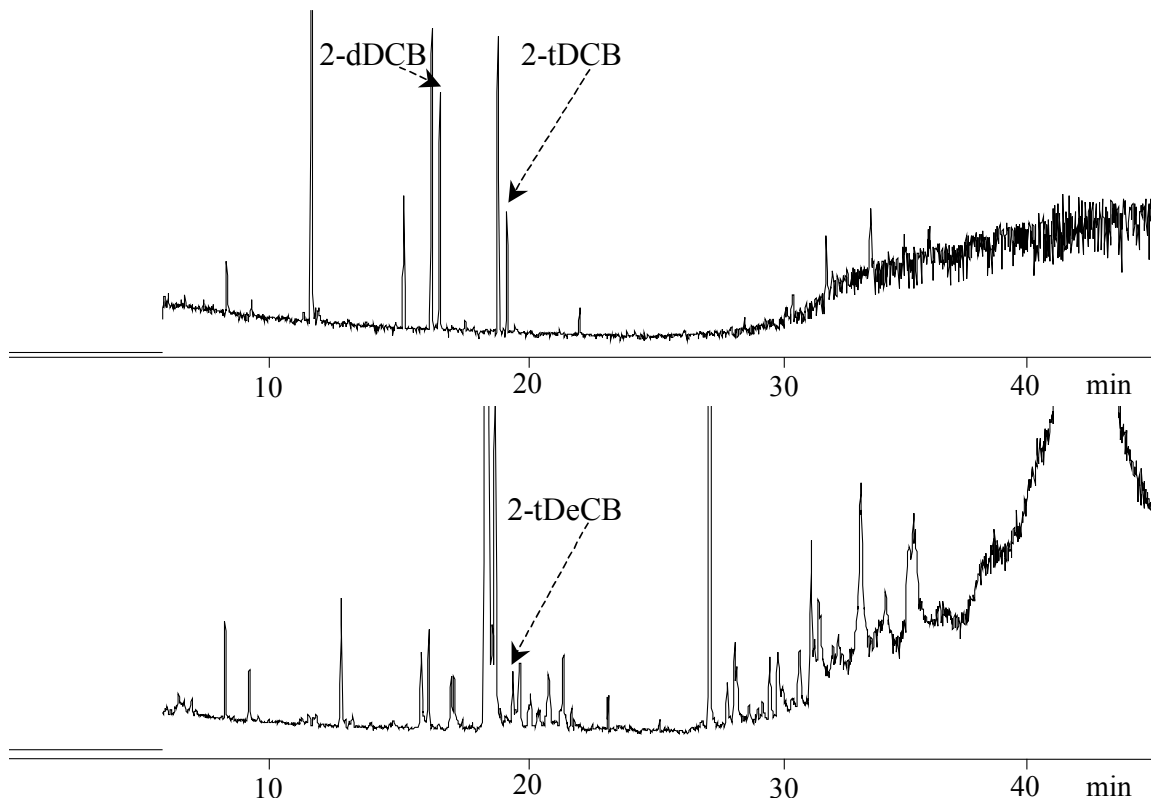


Figure N°26 : Chromatogrammes en phase gazeuse ($m/z=98$, composés saturés, $m/z=98+95$, composés insaturés) des 2-alkylcyclobutanones présentes dans un échantillon d'œuf ionisé à 5,0 kGy (colonne de 30 m, purification des extraits sur colonne échangeuse de cations).

Les résultats de nos travaux concernant la formation des 2-alkylcyclobutanones dans les aliments ionisés font état d'un taux de production moyen de l'ordre de $1,6 \text{ nmol} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{kGy}^{-1}$ et cela quel que soit l'acide gras précurseur considéré. Il est donc désormais possible d'évaluer la quantité de 2-alkylcyclobutanones produite lors du traitement ionisant d'un aliment, soit par exemple lors du traitement d'un échantillon de chair de poulet :

- 0,3 μg de 2-dDCB dans un gramme de matières grasses de chair de poulet.

Sachant que la quantité de matières grasses présente dans la chair de poulet est de l'ordre de 10% (m :m) et que cet aliment est ionisé à une dose de l'ordre de 3 kGy (dose maximale acceptée aux USA afin d'en assurer la pasteurisation), la quantité de 2-dDCB dans un gramme de chair de poulet sera donc :

- 0,09 μg de 2-dDCB dans un gramme de chair de poulet ionisée à 3 kGy.

Sachant que la chair de poulet n'est pas consommée crue, il convient de considérer que la cuisson de cet aliment génèrera des pertes de l'ordre de 20% (Crone *et al.*, 1992a). Il ne restera donc plus que

- 0,07 μg de 2-dDCB dans un gramme de chair de poulet ionisée à 3 kGy cuite.

Etant donné que l'acide palmitique, précurseur de la 2-dDCB, ne représente que 20% des acides gras présents dans cet aliment, la quantité totale de 2-alkylcyclobutanones présente dans la chair de poulet consommée sera donc de :

- **0,4 μg de 2-ACB dans un gramme de chair de poulet consommée cuite.**

Donc, lorsqu'un consommateur mange un repas contenant 200 g de chair de poulet cuite ionisée à 3 kGy, il ingèrera 80 μg de 2-alkylcyclobutanones. Si l'on considère que le consommateur présente un poids moyen de 70 kg, il aura consommé environ

1 μg de 2-alkylcyclobutanones/kg de poids corporel

Même si des résultats obtenus avec les animaux ne peuvent pas être transférés facilement sur les hommes, il semble tout de même intéressant, de considérer les résultats obtenus lors de

précédentes expériences au cours desquelles des animaux de laboratoires ont été nourris avec des aliments ionisés, donc contenant des 2-alkylcyclobutanones.

De nombreux travaux concernant des études toxicologiques au cours desquelles des animaux de laboratoire avaient été nourris avec des aliments ionisés (donc contenant des 2-alkylcyclobutanones) ont été précédemment publiés. Aucun effet nuisible n'a été noté (WHO 1999). Ainsi, par exemple, lors d'une très importante étude, (étude Raltech), 135 tonnes de viande de poulet ont été utilisées pour nourrir des animaux de laboratoire. La dose moyenne de rayonnement appliquée à la viande de poulet était une dose de stérilisation de 58 kGy, et la quantité de viande de poulet irradiée dans le régime animal était de 35% (sur une base de poids sec). Malgré les fortes quantités d'aliments ionisés ingérées par les animaux, aucun effet nuisible attribuable au traitement ionisant n'a pu être observé (Thayer *et al.* 1987).

Une étude postérieure a permis de confirmer que ces aliments ionisés contenaient bien des 2-alkylcyclobutanones et que ces dernières étaient encore présentes en quantités considérables dans ces aliments, même après une conservation de 12 années au congélateur (-20°C) (Crone *et al.* 1992b). En fait les auteurs de ce travail ont rapporté que 10 µg de 2-dDCB/g de lipides pouvaient être retrouvés dans les aliments ainsi conservés, indiquant de la sorte qu'une perte de 50% des 2-alkylcyclobutanones initialement présentes dans l'alimentation animale pouvait être envisagée lors d'un stockage prolongé (12 ans) de ces aliments. De plus, il convient de considérer le fait que les aliments utilisés dans l'étude Raltech ont subi une étape de lyophilisation avant d'être incorporés dans le régime alimentaire, ce qui peut conduire à des pertes de 60% des 2-alkylcyclobutanones générées lors du traitement ionisant.

Grossièrement, la teneur en 2-dDCB dans l'alimentation animale utilisée à l'époque (dose d'ionisation 58 kGy, 35% chair de poulet, par rapport au poids sec, teneur en matières grasses (MG) de 12-13%, recouvrement des 2-alkylcyclobutanones après lyophilisation 40%) peut ainsi être évaluée :

$$0,3 (\mu\text{g/g MG/kGy}) \cdot 58(\text{kGy}) \cdot 0,125(\text{g MG/g}) \cdot 0,35 \cdot 0,4 = 0,3 \mu\text{g 2-dDCB/g d'aliment.}$$

La véritable concentration en 2-dDCB dans l'alimentation animale est très difficile à évaluer avec précision étant donné qu'elles sont liées aux pertes par lyophilisation (qui sont elles même imprécises).

Etant donné que l'acide palmitique ne représente que 20% des acides gras présents dans la chair de volaille, et considérant que la production de ces composés ne dépend pas de la longueur de la chaîne alkyle, la quantité totale de 2-alkylcyclobutanones présente dans l'alimentation animale était de l'ordre de **1,5 µg de 2-alkylcyclobutanones /g d'aliment.**

En considérant que la ration quotidienne des souris utilisée au cours de l'étude Raltech était de 5 g et que le poids moyen d'un animal était de 30 g, la quantité de 2-alkylcyclobutanone consommée devient alors égale à

250 µg/kg de poids corporel

Dans le cas où l'expérience serait réalisée avec des rats (ration quotidienne de 20 g, poids d'un individu 500 g), la quantité de 2-alkylcyclobutanone consommée devient alors égale à 300 µg/g ou encore

60 µg/kg de poids corporel

Ces calculs montrent que les quantités de 2-alkylcyclobutanones qui ont été consommées par les animaux dans l'étude Raltech étaient très importantes, en comparaison avec la quantité de ces produits qu'un consommateur ingérerait lors de la consommation de produits alimentaires ionisés.

Les quantités de 2-alkylcyclobutanones utilisées dans les études toxicologiques réalisées dans le cadre de ce projet INTERREG sont encore plus élevées que dans l'étude Raltech. Cela est dû aux normes pharmacologiques qui imposent d'utiliser des doses très importantes de

substances d'essai lors des études toxicologiques. Lorsque des effets toxiques sont trouvés, un coefficient de sécurité peut alors être établi. Et dans le cas où des effets génotoxiques ou mutagènes seraient observés le risque doit alors être évalué et des études comparatives avec d'autres composés toxiques doivent être entreprises.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Mesdames M. Fisher, S. Jung et V. Zumsteeg pour leur écoute, leurs conseils et leur assistance technique.

RÉFÉRENCES

Anonym (1978), Corps gras d'origines animale et végétale – Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras, Norme ISO 5509 (Genève).

Anonym (1996a), Foodstuffs. Detection of irradiated food containing bones. Method by ESR spectroscopy, European Committee for Standardization (Brussels), EN 1786.

Anonym (1996b), Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones, European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

Boyd R. D., Crone A. V. J., Hamilton J. T. G., Hand M. V., Stevenson M. H., Stevenson P. J. (1991), Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken, *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 789-792.

Crone A. V. J., Hamilton J. T. G., Stevenson M. H. (1992a), Effect of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for irradiated chicken, *J. Sci. Food Agr.*, **58**, 249-252.

Crone A. V. J., Hamilton J. T. G., Stevenson M. H. (1992b), Detection of 2-DCB in radiation sterilized chicken meat stored for several years, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **27**, 691-696.

Crone A. V. J., Hand M. V., Hamilton J. T. G., Sharma N. D., Boyd D. R., Stevenson M. H., (1993), Synthesis, characterization and use of 2-tetradecylcyclobutanone together with other cyclobutanones as markers of irradiated liquid whole egg, *J. Sci. Food Agr.*, **62**, 361-367.

Kuntz F., Marchioni E., Strasser A. (1991), Homogénéisation de la dose déposée dans un produit ionisé aux électrons accélérés, In *Proceedings of an International Symposium on High Dose Dosimetry for Radiation Processing*, The International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria), 5-9 November 1990, Report IAEA SM 314/30, 479-488.

Ndiaye B., Horvatovich P., Miesch M., Hasselmann C., Marchioni E. (1999a), 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs III. Improvement of the field of application on the EN 1785 method by using silver ion chromatography, *J. Chromatogr. A*, **858**, 109-115.

Ndiaye B., Jamet G., Miesch M., Hasselmann C., Marchioni E. (1999b), 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 437-445.

Stevenson M.H., Crone A.V.J. and Hamilton J.T.G. (1990), Irradiation detection, *Nature*, **344**, 202-203.

Stevenson M.H., Crone A.V.J., Hamilton J.T.G. and Mc Murray C.H. (1993) The use of 2-dodecylcyclobutanone for the identification of irradiated chicken meat and eggs. *Radiat. Phys. Chem.*, **42**, 363.

Stevenson M.H. (1994), Identification of irradiated foods, *Food Technol.*, **48**, 141-144.

Stevenson M.H. (1996), Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial, In *Detection Methods for Irradiated Food - Current Status*, C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray and J. Pearce, eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 269-284.

Thayer D.W., Christopher J.P., Campbell L.A., Ronning D.C., Dahlgren R.R., Thomson G.M., Wierbicki E. (1987), Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken, *J. Food Prot.*, **50**, 278-288.

2.6 ETUDES TOXICOLOGIQUES

2.6.1. Cytotoxicité et génotoxicité des 2-alkylcyclobutanones vis à vis des lignées de cellules tumorales humaines (HT 29 et HT 29 cl 19 A)

Henry Delincée, Christiane Soika, Péter Horvatovich, Cornelia Hodapp et
Gerhard Rechkemmer

Institut de Physiologie Nutritionnelle, Centre Fédéral de Recherche Nutritionnelle, Karlsruhe

INTRODUCTION

Cette étude vise à caractériser le potentiel toxicologique des 2-alkylcyclobutanones, un groupe de composés formés, lors des traitements ionisants, dans les triglycérides alimentaires. Ces composés contiennent le même nombre (n) d'atomes de carbone que leurs acides gras précurseurs et leur chaîne alkyle, située en position 2 du cycle en contient n - 4. Ainsi, un traitement ionisant des acides palmitique, stéarique, et oléique donnera lieu à la production respectivement des 2-dodécylcyclobutanone, 2-tétradécylcyclobutanone et 2-(tétradec-5'-ényl)-cyclobutanone cette dernière pouvant se présenter sous ses deux configurations isomériques (*cis* et *trans*). Jusqu'à aujourd'hui, personne n'a réussi à mettre en évidence de 2-alkylcyclobutanones dans des aliments non ionisés. C'est pourquoi il a semblé important de déterminer le potentiel toxicologique de ces composés. Des études toxicologiques précédentes ont porté sur l'action de la 2-dodécylcyclobutanone sur des cellules de rat (*in vivo et in vitro*) et des cellules humaines de colon (prélevées par biopsie). En utilisant la technique de micro-électrophorèse des cellules isolées (test de la comète), il a été possible de mettre en évidence (Delincée et Pool-Zobel, 1998, Delincée *et al.*, 1999) des dommages portés par l'ADN cellulaire.

Malheureusement, dans ces expériences l'identité et la pureté réelles du composé n'avaient pas été vérifiées avant que les essais aient été effectués. Une caractérisation postérieure du composé (pureté, spectre de masse, etc...) n'était pas possible. Depuis lors, une nouvelle synthèse de 2-alkylcyclobutanones a été développée (Miesch *et al.*, 1999, 2001), et ces substances, de grande pureté et bien caractérisées peuvent être utilisées pour les études toxicologiques de ce projet.

Puisque l'étude précédente a permis de montrer un effet sur les cellules du côlon, il a été décidé de réaliser cette nouvelle étude à nouveau avec des cellules du côlon, qui est le siège de cancers liés à l'alimentation, mais également avec plusieurs 2-alkylcyclobutanones. Pour les expériences présentées dans ce travail il a été décidé d'étudier l'effet des 2-alkylcyclobutanones sur des cellules tumorales d'origine humaines qui sont généralement utilisées comme modèles lors d'expériences *in vitro* (souches HT 29 et HT 29 cl 19A déjà disponibles à l'Institut de Physiologie Nutritionnelle au Centre Fédéral de Recherches pour la Nutrition de Karlsruhe (BFE)). L'influence sur la viabilité des cellules, de diverses concentrations de 2-alkylcyclobutanones mises en contact avec les deux lignées cellulaires pendant différentes durées d'incubation a été étudiée. De même, une étude génotoxique (possibles dégradations des ADN) de ces 2-alkylcyclobutanones a été réalisée en utilisant le test de la comète.

MATERIEL ET METHODES

Cultures de cellules

Les cellules tumorales HT 29 de côlon humain ont été obtenues par le Dr Fogh de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Sloan Kettering (Rye, NY, Etats-Unis) (Fogh *et al.* 1977) à partir d'une tumeur primaire développée par une femme d'origine caucasienne âgée de 44 ans souffrant, en 1964, d'un adénocarcinome. La lignée cellulaire a été obtenue auprès de la Collection allemande de Micro-Organismes et de Cultures de Cellules (Drexler *et al.* 1997). Ces

cellules HT 29 ont été cultivées à 37°C dans un milieu Dulbecco Eagle modifié (DMEM) supplémenté par un ajout de (10 % v/v) de sérum fœtal de bœuf et d'un mélange (1 % v/v) pénicilline (5000 U/ml)/streptomycine (5000 µg/ml), dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂ dans des fioles pour culture de cellules T₈₀ (les milieux et les suppléments de culture ont été fournis par la Société Life Technologies, Karlsruhe).

Un clone HT 29 cl 19A a été obtenu après traitement des cellules HT 29 par le butyrate de sodium (Augeron et Laboisse, 1984). Les cellules HT 29 indifférenciées développaient alors de nouvelles propriétés, telles qu'une adhérence accrue au fond des flacons et la possibilité de former des "foyers plats". A partir de ces dernières cellules une lignée de cellules clone HT 29 cl 19A a été établie qui présentait une polarité cellulaire morphologique caractérisée par la présence d'une face apicale et d'une face basolatérale par des complexes de jonction. Ces cellules autorisaient donc le transport actif trans-épithélial de substances en solution. Les cellules HT 29, disponibles au stade différencié ou indifférencié, peuvent être à présent testées pour leur sensibilité vis à vis des composés toxiques et cela dans diverses étapes de leur développement. La culture des cellules clone a été réalisée selon la méthode proposée par Abrahamse et Rechkemmer (2001).

Trypsination

Environ 0.1×10^5 cellules/cm² ont été inoculées dans des flacons de culture de cellules T₈₀. Le milieu de culture a été changé tous les 2 jours. Aux environs de 80 - 100 % de confluence, le milieu de culture a été retiré, les cellules ont été rincées avec un tampon phosphate (Dulbecco's PBS, sans Ca²⁺ et Mg²⁺, sans bicarbonate de sodium, pH 7,0 - 7,2), traitées avec 1,5 ml de solution de trypsine-EDTA (0,5 g de trypsine et 0,2 g d'EDTA par litre de solution de Puck modifiée [0,4 g/l KCl; 8,0 g/l NaCl; 0,35 g/l NaHCO₃]) et incubées pendant 3 à 5 minutes jusqu'à ce que les cellules se détachent du fond du flacon de culture. La réaction a été arrêtée par ajout de 9 ml de milieu de culture et les cellules ont été transférées dans un tube en polypropylène (15 ml), centrifugées (200 g pendant 5 minutes) et décantées. Le milieu surnageant a été éliminé et les cellules ont été remises en suspension dans du milieu de culture. La concentration cellulaire a été estimée par comptage avec une chambre de Neubauer. La concentration des cellules a été ajustée à la valeur recommandée. Toutes les solutions ont été fournies par la Société Life Technologies (Karlsruhe).

Substances test

Les 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB), 2-(tétradéc-5'-ényl)-cyclobutanone (2-tDeCB, mélange ~85 % *cis*-/~15 % *trans*-), 2-tDeCB *cis*- pure, 2-tDeCB *trans*- pure, 2-dodécylcyclobutanone (2-dDCB), et un produit de dégradation oxydative probable de la 2-tDCB, la γ -stéarolactone ont été synthétisées par le Laboratoire de Chimie Organique Synthétique (UMR 7123) de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, partenaire français associés à ce travail. La synthèse, la caractérisation et la pureté (97 %) des composés produits ont été décrits dans la littérature (Miesch *et al.* 1999, 2001).

Solubilité des substances test

La chaîne carbonée située en position 2 du cycle de la 2-alkylcyclobutanone limite considérablement la solubilité de ces composés dans les tampons aqueux utilisés dans cette étude. Après plusieurs tentatives il est clairement apparu que l'éthanol absolu (EtOH) était le solvant le plus approprié. Les propriétés physico-chimiques des 2-alkylcyclobutanones restaient intactes, même après leur conservation pendant plusieurs jours dans ce solvant (essai réalisé par M. Miesch).

La concentration maximale d'éthanol tolérée par les lignées cellulaires HT 29 et HT 29 cl 19A a été évaluée dans des expériences préliminaires. Aucun dommage de ces cellules n'a pu être observé lorsque celles-ci étaient dans des milieux contenant de l'EtOH à une concentration

finale inférieure ou égale à 2 %. À des concentrations plus élevées, les cellules ne pouvaient pas survivre. La quantité maximale de 2-tDCB qui peut être dissoute dans la suspension de cellules contenant 2 % de EtOH était d'environ 100 µg de 2-tDCB/ml, ce qui correspond à environ 400 µM. Pour cette raison, les concentrations étudiées de 2-tDCB ont été fixées à 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM et 25 µM. Ces concentrations finales ont été également choisies pour tous les autres composés étudiés (2-alkylcyclobutanones et lactone)

Estimation de la cytotoxicité

Les cellules ont été directement incubées avec les produits testés en utilisant des plaques de microtitration (24 et 96 puits). Des sels de tétrazolium ont été employés pour mesurer la viabilité des cellules. La réduction supposée du sel de tétrazolium par la déhydrogénase mitochondriale qui donne lieu à la production de formazans (fortement colorés), a été utilisée comme indicateur de cytotoxicité car cette réaction permet d'estimer le nombre de cellules viables (Cook et Mitchell, 1989). Selon Berridge *et al.* (1996) plusieurs sels de tétrazolium peuvent correspondre à différentes activités enzymatiques cellulaires. Par exemple lors de l'utilisation du sel de MTT (3-[4,5-Diméthyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphényl-tétrazoliumbromide) la réduction se produirait principalement de façon intracellulaire, catalysée par des enzymes du réticulum endoplasmique, tandis que lors de l'utilisation du sel WST-1 (4-[3-(4-iodophényl)-2(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzen-disulfonate), la réduction se produirait principalement à la surface extracellulaire de la membrane plasmique. Les deux protocoles (MTT et WST-1) sont utilisés couramment à l'Institut de Physiologie Nutritionnelle du Centre Fédéral de Recherches pour la Nutrition de Karlsruhe (BFE). Les sels MTT et WST-1 de tétrazolium ont été fournis par les Sociétés Sigma, Munich et Roche Molecular Biochemicals, Mannheim respectivement.

Les mesures MTT (Mosmann, 1983; Green *et al.* 1984) ont été effectuées avec des plaques de micro-titration 24-puits, tandis que les analyses WST-1 (Ishiyama *et al.* 1995) ont été exécutées avec des plaques 96-puits. Les sels hydrosolubles de tétrazolium sont des précurseurs jaunâtres qui forment après réaction de réduction des pigments très colorés (les formazans). Ces formazans, produit par le métabolisme des cellules viables permettent une détermination quantitative pratique grâce à un spectrophotomètre (lecteur de microplaques). La quantité de colorant formée est directement corrélée au nombre de cellules métaboliquement viables présentes dans la culture.

Lors des tests, les cellules sontensemencées dans les puits des plaques de micro-titration et incubées pendant environ 2 jours dans une atmosphère humidifiée (37°C, 5 % de CO₂). Les substances à tester ont été ajoutées soit immédiatement, soit après 1 jour, soit après les 30 dernières minutes d'incubation. Le sel de tétrazolium est alors ajouté. Après un temps de réaction variable l'absorbance des échantillons est mesurée à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaques de micro-titration (Spectrafluor plus/TECAN, Durham, NC, USA) avec une longueur d'onde de référence de 690 nm. Dans le cas du sel WST-1, aucune lyse n'a été nécessaire et les mesures ont été réalisées à 450 nm avec un lecteur de microplaques Soft Max (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA) à une longueur d'onde de référence de 650 nm. Les cellules en suspension dans le milieu de culture pur, sans ajout de composés étudiés ou de solvant (EtOH, 2%) ont servi de contrôle. L'effet du solvant a été évalué par une mesure faite avec de l'éthanol à une concentration finale de 2 %. Une mesure du blanc (sans cellules) mais avec les mêmes volumes de sel de tétrazolium (solution MTT ou WST-1) et de milieu de culture a permis d'évaluer le bruit de fond. Les mesures MTT ont été effectuées deux fois, c'est à dire avec 2 plaques de micro-titration 24-puits, chaque concentration d'essai ayant fait l'objet de 2 à 3 mesures par plaque. La mesure du bruit de fond a été réalisée dans 5 puits et la valeur moyenne a été calculée et soustraite de la valeur moyenne des résultats expérimentaux. L'analyse WST-1 a été exécutée à l'aide d'une plaque de micro-titration 96-puits, chaque concentration d'essai ayant fait l'objet de 3 à 5 mesures. Les essais ont été répétés au moins trois fois. La valeur moyenne du bruit de fond a été mesurée dans 3-5 puits. La valeur moyenne des mesures a été calculée et

soustraite des mesures expérimentales. Les valeurs d'absorbance obtenues ont été normalisées par la valeur de l'absorbance obtenue avec les cellules de contrôle (2% EtOH), procurant ainsi une valeur exprimée en % de viabilité (100 % de viabilité pour les cellules pures). Les deux tests MTT et WST-1 ont été décrits en détails par Horvatovich (2001).

Afin de déterminer leur cytotoxicité, les substances à tester n'ont pas été ajoutées immédiatement. Les cellules ont étéensemencées et cultivées jusqu'à confluence, puis les substances ont été ajoutées pendant 0,5, 24 ou 48 heures. Pour cette mesure, le test MTT a été modifié et réalisé avec des plaques 96 puits. Cette expérience a été réalisée seulement pour les cellules HT 29 cl 19A.

Détermination de la génotoxicité

Dans une étude précédente utilisant les cellules primaires de côlon de rat, le temps d'incubation des cellules avec la 2-dodécylcyclobutanone a été de 30 minutes à 37°C (Delincée et Pool-Zobel, 1998). Des durées d'incubation plus importantes des cellules primaires de côlon de rat (sans 2-alkylcyclobutanones) conduiraient certainement à une importante diminution de leur viabilité (Wollowski, 1998). Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans le cadre de ce projet avec ceux obtenus dans le cadre de travaux précédents, une durée d'incubation identique de 30 minutes a été choisie, bien que les cellules tumorales utilisées permettraient d'utiliser des temps d'incubation supérieurs sans craindre de grandes diminutions de leur viabilité.

20 µl du composé étudié (dissous dans du EtOH à 2%) ont été ajoutés à 1 ml de suspension cellulaire (~2.10⁶ cellules) dans un tube Falcon (14 ml, diamètre interne : 17 mm, longueur : 100 mm) placé dans un incubateur agité (Lauda CS 20, ~120 rotations/min) à 37°C pendant 30 min. Avant et après l'incubation la viabilité des cellules a été contrôlée en utilisant la méthode d'exclusion au bleu Trypan (Pool *et al.*, 1990, Pool-Zobel *et al.*, 1994).

Les dégradations de l'ADN des cellules tumorales humaines ont été étudiées en utilisant le test de la comète (Pool-Zobel *et al.*, 1994, 1997, 1999) en conditions alcalines (pH > 13) (Rojas *et al.*, 1999, Tice *et al.*, 1999). Les expériences ont été effectuées en duplicate, avec deux lames de microscope contenant environ 50 cellules chacune.

Les observations ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence équipé d'un système d'analyse d'image ('Colourmorph, version 5,0', ou 'Comet Assay II Image Analysis', Perceptive Instruments, Halstead, Grande Bretagne). Les dégradations des ADN ont été exprimées en pourcentage de fluorescence de l'ADN présent dans la queue de la comète (% d'intensité de queue).

RESULTATS ET DISCUSSION

Cytotoxicité

Les résultats obtenus en application du test MTT avec les cellules HT 29, lors de l'étude de la cytotoxicité des différentes 2-alkylcyclobutanones et de la γ -stéarolactone, sont présentées dans la Figure N°27. Avec un temps d'incubation de 30 minutes à 37°C, il était impossible d'observer une quelconque cytotoxicité (par comparaison avec le contrôle) - même lorsque la concentration des composés étudiés atteignait 400 µM. Cependant, avec une incubation plus longue (entre 1 et 2 jours) avec de plus importantes concentrations (>50 µM) la cytotoxicité des composés étudiés a pu être clairement mise en évidence. Le contrôle, ne contenant que de l'éthanol à une concentration finale de 2% n'a montré aucune influence sur la viabilité des cellules, même après deux jours d'incubation puisque les résultats obtenus étaient pratiquement identiques à ceux qui ont été obtenus avec des cellules en suspension pure.

MTT test on HT 29 stem cells

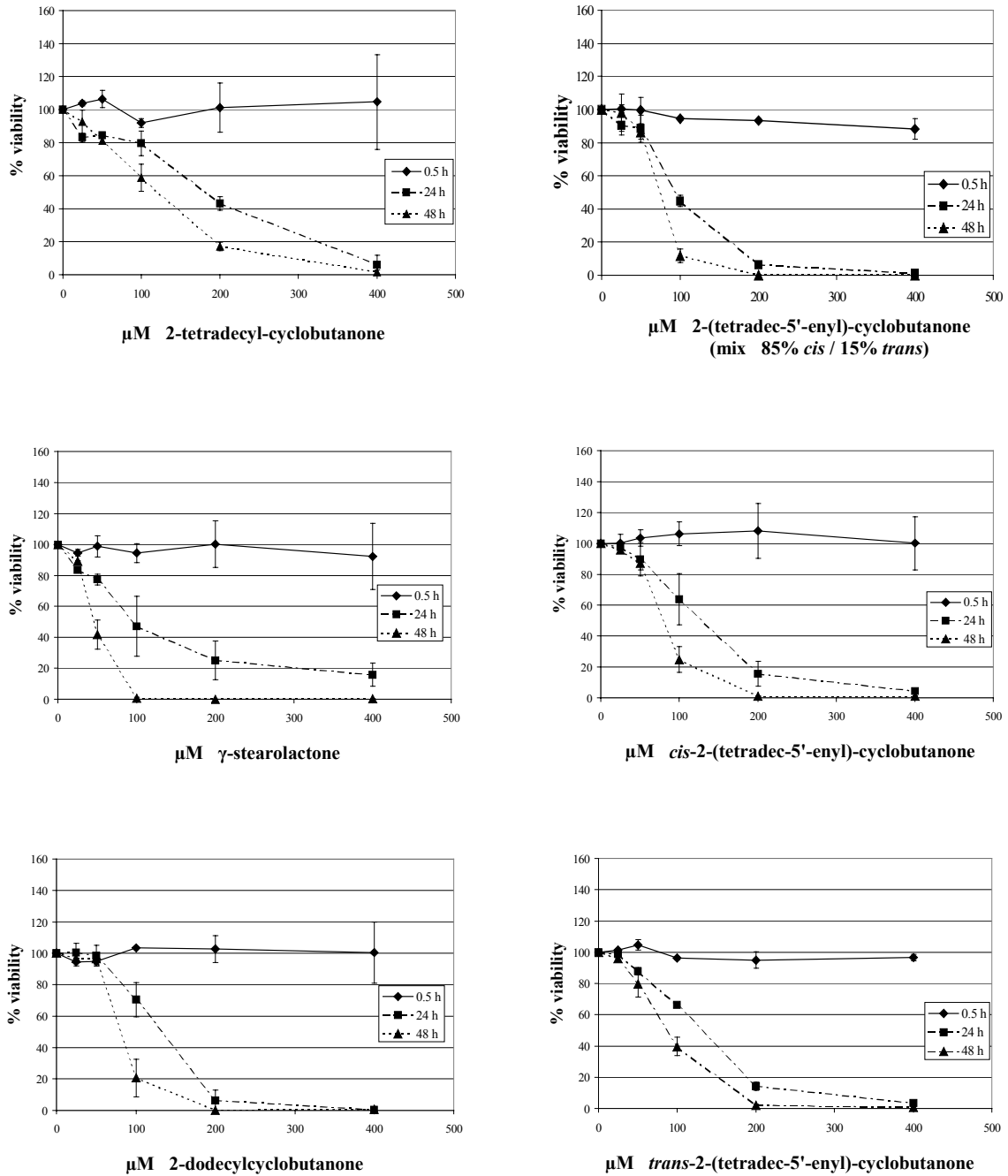


Figure N°27 : Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'ethanol) des cellules tumorales de côlon HT 29 incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkylcyclobutanones et γ -stéarolactone à différentes concentrations (MTT test, Moyenne \pm SEM).

Par comparaison, il semblerait que la 2-tDCB présente des effets toxiques moins importants alors que la 2-tDeCB et la γ -stéarolactone soient à l'origine d'une baisse de la viabilité cellulaire. Les composés à chaîne alkyle courte (la 2-dDCB) présentent une cytotoxicité plus importante que celle de la 2-tDCB. Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus avec les cellules différenciées HT 29 clone 19A (Fig. 28).

MTT test on HT 29 clone 19A cells

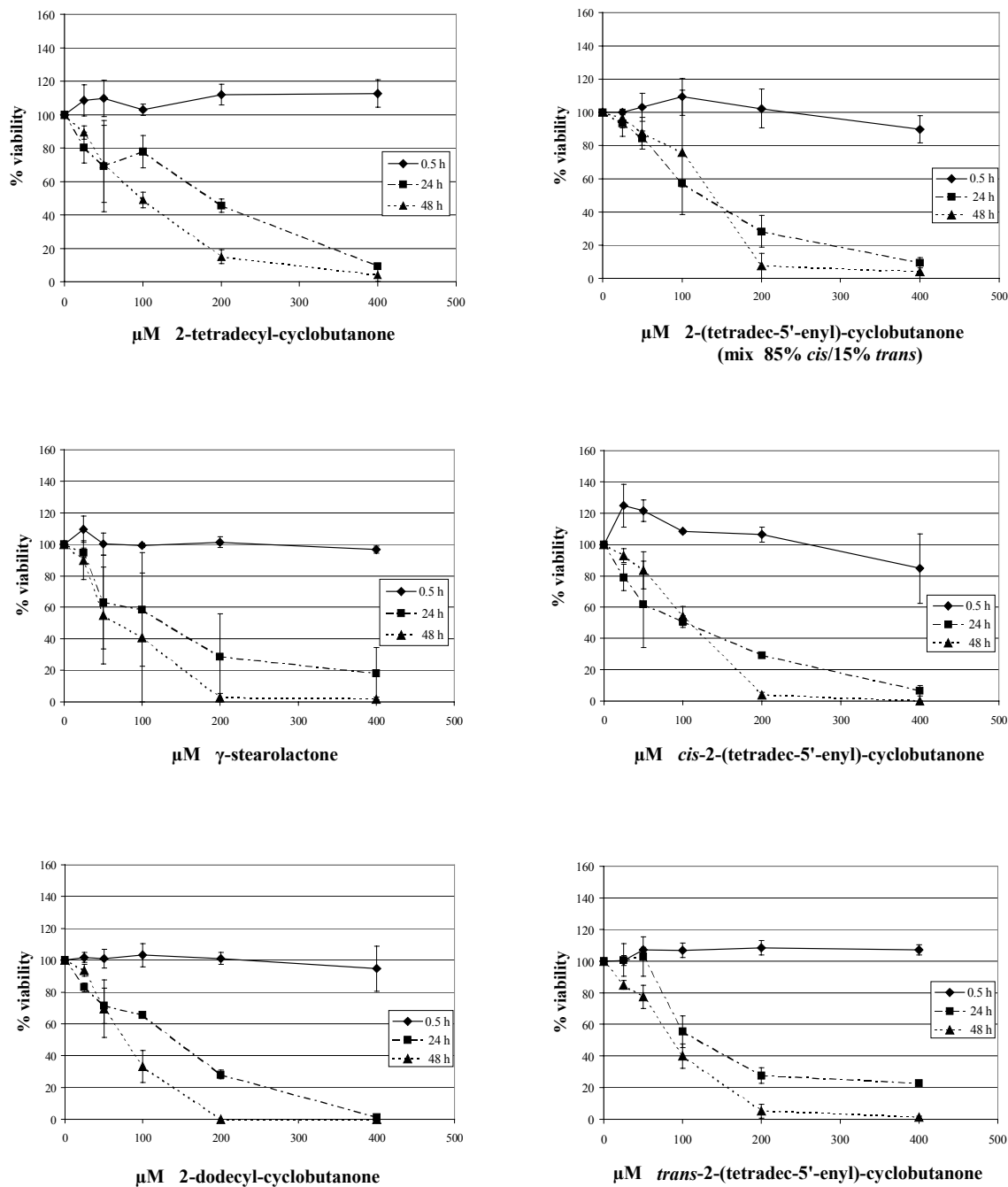


Figure N°28. Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'ethanol) des cellules tumorales de côlon HT 29 clone 19 A incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkylcyclobutanones et γ -stéarolactone à différentes concentrations (MTT test, Moyenne \pm SEM).

Quand les tests de viabilité ont été effectués avec le sel WST-1, la cytotoxicité observée, bien que moins intense qu'avec le sel de MTT, dépendait également du temps d'incubation et de la concentration de substance d'essai.

WST test on HT 29 stem cells

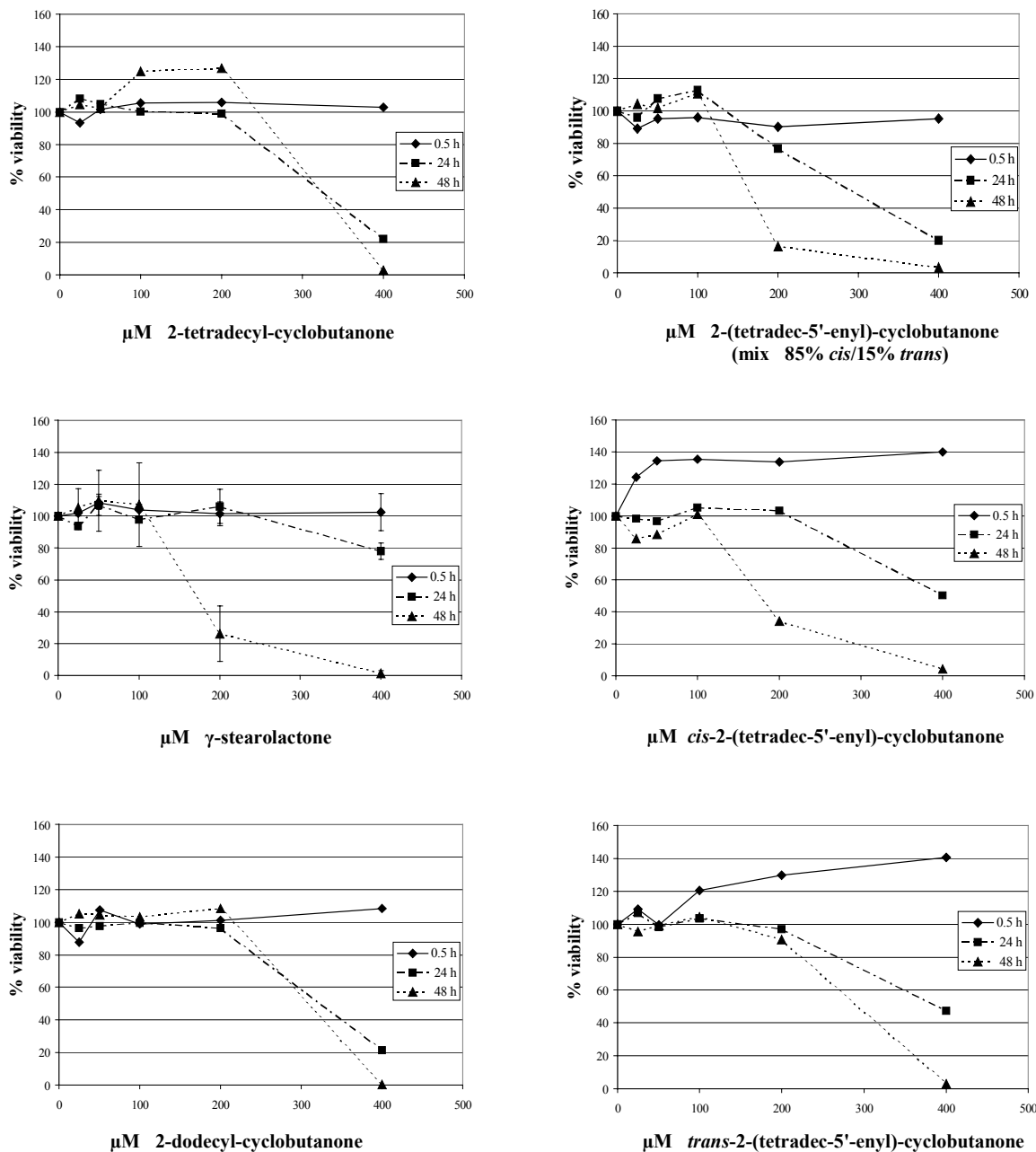


Figure N°29. Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'éthanol) des cellules tumorales de côlon HT 29 incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkylcyclobutanones et γ -stéarolactone à différentes concentrations (WST-1 test, Moyenne \pm SEM).

Il apparaît qu'avec une concentration supérieure à 100 μM , une importante diminution de la viabilité des cellules peut être observée lorsque les durées d'incubation sont importantes (24 et 48 h). Les Figures 29 et 30 présentent les résultats obtenus respectivement avec les cellules HT 29 et les cellules différenciées HT 29 cl 19A.

WST test on HT 29 clone 19A cells

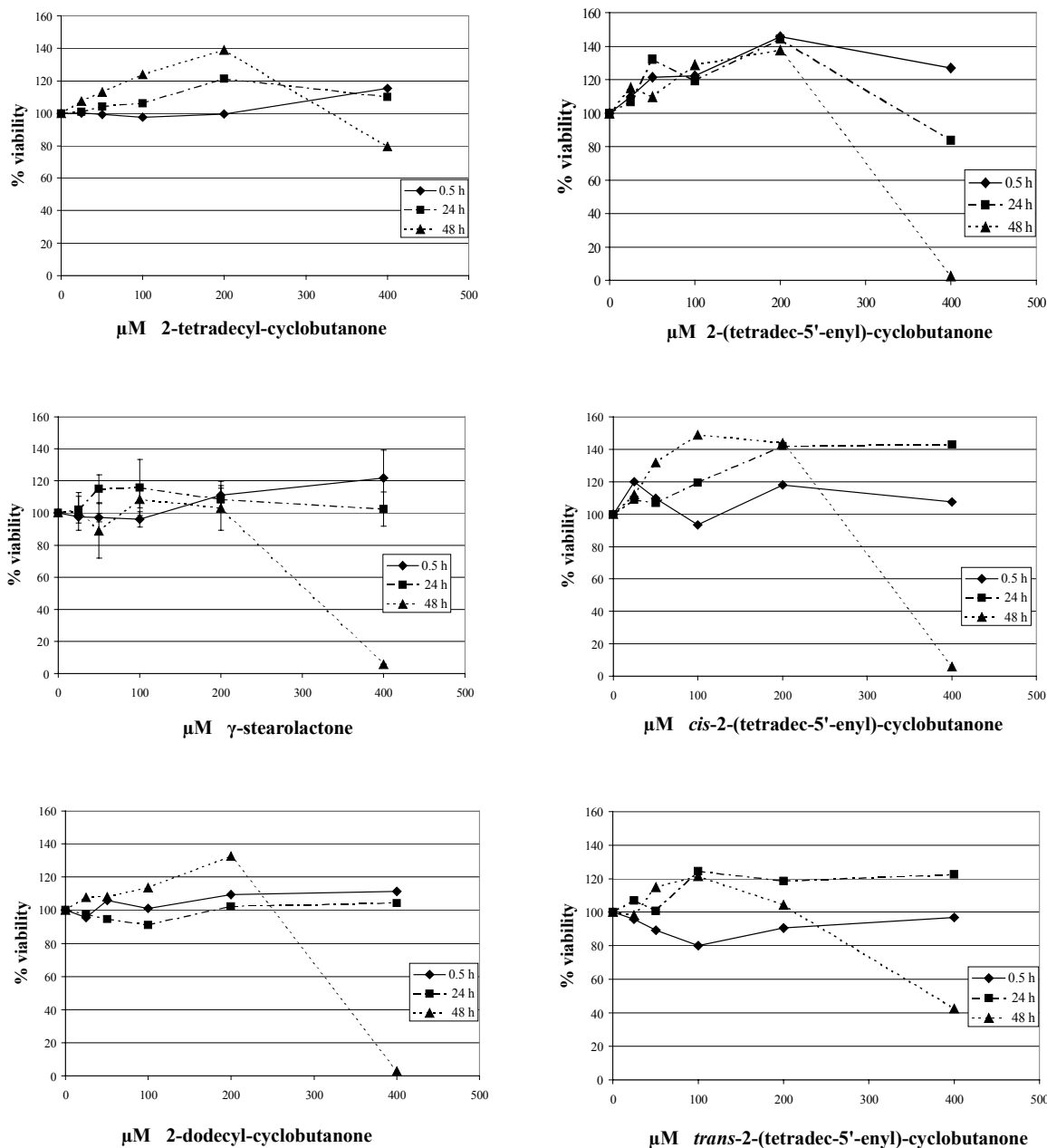


Figure N°30. Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'ethanol) des cellules tumorales de côlon HT 29 clone 19 A incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkylcyclobutanones et γ -stéarolactone à différentes concentrations (WST-1 test, Moyenne \pm SEM).

La mesure de viabilité utilisant les cellules confluentes HT 29 cl 19A a permis de mettre en évidence une diminution notable des substances d'essai (Fig. 31 et 32) par rapport aux premières mesures. Cependant, certaines de ces substances d'essai, utilisées à des concentrations plus élevées (>200 μM) et pendant des durées d'incubation plus importantes (24 h et 48 h), ont présenté une diminution de la viabilité des cellules inférieures à 70 %.

MTT test on HT 29 clone 19A cells (confluent)

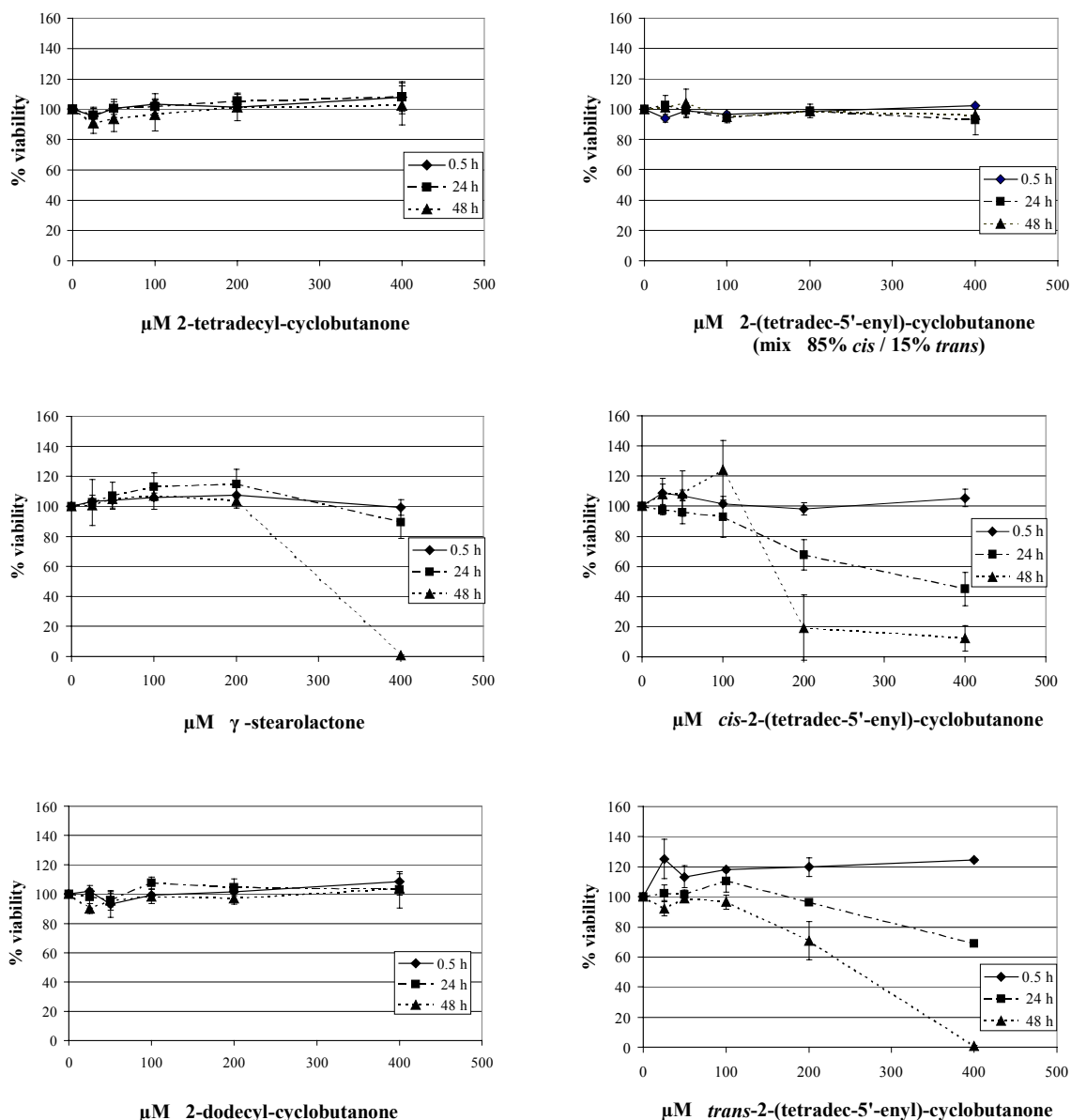


Figure N°31 : Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'éthanol) des cellules tumorales confluentes de côlon HT 29 clone 19 A incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkyl-cyclobutanones et γ -stéarolactone à différentes concentrations (MTT test, Moyenne \pm SEM).

WST test on HT 29 clone 19A cells (confluent)

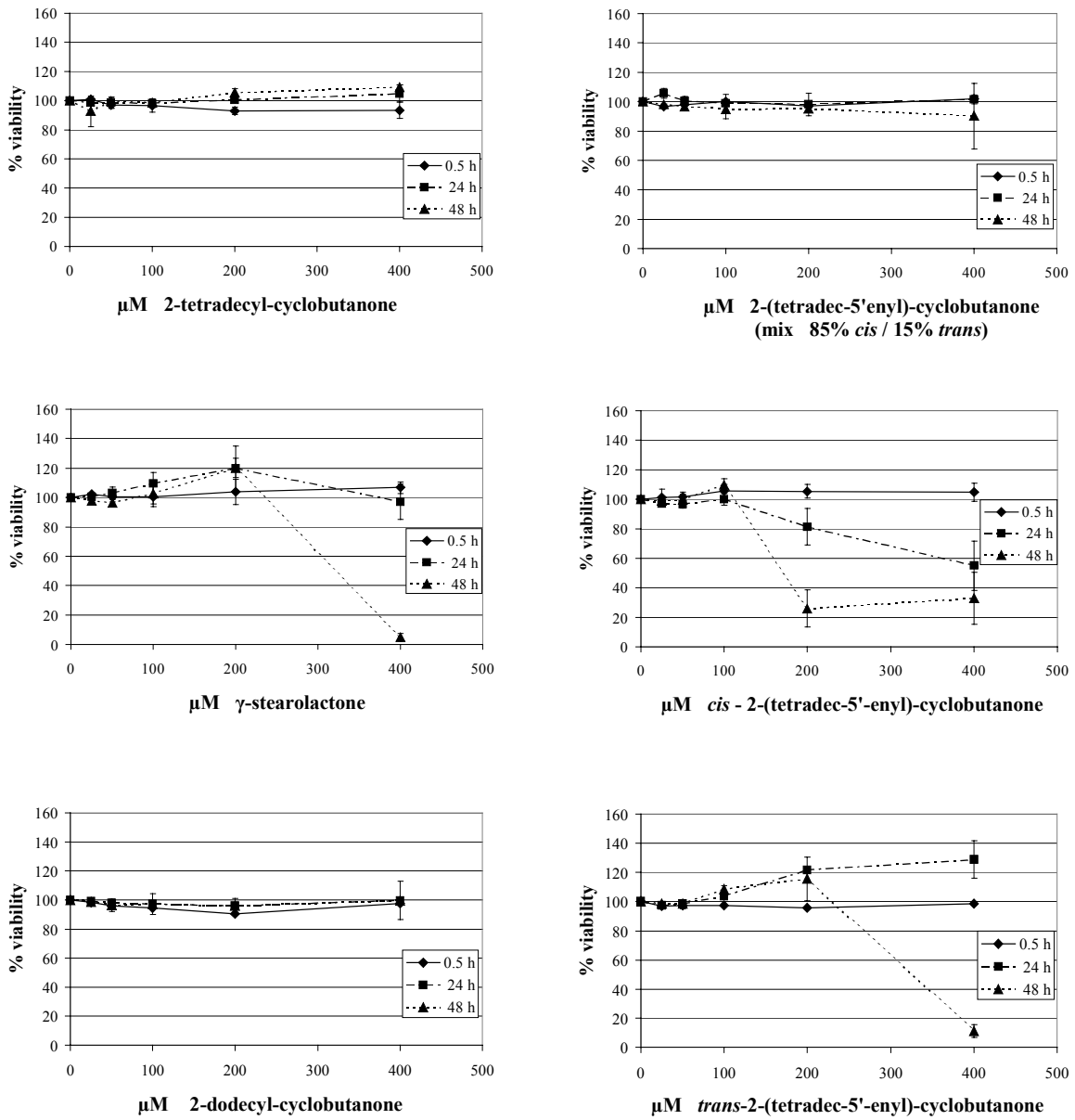


Figure N°32 : Viabilité (par rapport au contrôle avec 2% d'ethanol) des cellules tumorales confluentes de côlon HT 29 clone 19 A incubées 0,5 ; 24 et 48 h avec différentes 2-alkyl-cyclobutanones et γ-stéarolactone à différentes concentrations (WST-1 test, Moyenne ± SEM).

Le test de la comète est une méthode de criblage rapide destiné à la détection des substances génotoxiques (Henderson *et al.*, 1998, Anderson *et al.*, 1998, Tice *et al.*, 2000). Ce test de la comète a été déjà employé afin de mesurer des ruptures de brin d'ADN génomique (Delincée et Pool-Zobel, 1998) lors d'une précédente étude *in vitro* portant sur la 2-dodécylcyclobutanone et ses effets sur les cellules primaires côlon de rat et les cellules humaines de côlon prélevées par biopsie. Au cours de la présente étude *in vitro* menée avec plusieurs 2-alkylcyclobutanones et la γ -stéarolactone (probablement formée par dégradation oxydative de la 2-tDCB), le test de la comète a été utilisé à nouveau afin d'établir une comparaison entre les propriétés génotoxiques des différentes 2-alkylcyclobutanones.

Les récentes règles d'utilisation du test de la comète (Tice *et al.*, 2000) soulignent les erreurs d'interprétation qui peuvent résulter d'une dégradation d'ADN génomique dues à des effets cytotoxiques. En effet, puisque des dommages d'ADN génomique sont corrélés à la mort des cellules, il est très important de prendre garde à ce que la dose testée la plus élevée n'induisse pas de cytotoxicité excessive et que celle-ci soit évaluée lors de chaque réalisation du test de la comète. C'est pourquoi, en plus des tests de coloration au bleu de Trypan (qui peut sous estimer la cytotoxicité, car il est basé sur l'intégrité des membranes cellulaires) nous avons réalisé des tests de cytotoxicité avec les sels de tétrazolium (MTT et WST-1). Les diminutions des viabilités observées à l'aide de ces tests doivent rester inférieures à 30% (Anderson *et al.*, 1998, Henderson *et al.*, 1998, Tice *et al.*, 2000). Afin de remplir ces conditions et de pouvoir discerner entre un effet cytotoxique et génotoxique, la durée d'incubation a été limitée à 30 minutes à 37°C. Ces conditions expérimentales permettent également de comparer les résultats obtenus avec ceux des études précédentes, dans lesquelles une durée d'incubation 30 minutes à 37°C a également été appliquée avec des cellules primaires de côlon de rat et les cellules humaines de côlon prélevées par biopsie (Delincée et Pool-Zobel 1998).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été utilisé comme contrôle positif, puisque ce composé possède la propriété bien connue de pouvoir faire des lésions sur les ADN (Collins *et al.*, 1995, Pool-Zobel et Leucht 1997, Pool-Zobel *et al.*, 1999). La concentration de peroxyde d'hydrogène utilisée a été de 500 μ M, ce qui est suffisant pour créer des lésions aux ADN lors d'incubation de cellules pendant 30 minutes à 37°C. Bien entendu, des phénomènes de réparation des lésions induites par le peroxyde d'hydrogène se produisent dans la cellule, même dans les conditions d'incubation retenues dans notre étude (Collins *et al.*, 1995, Vosseler 2000). Il a été décidé d'utiliser les mêmes conditions expérimentales pour le contrôle positif que pour les substances d'essai. Le peroxyde d'hydrogène a été dissout directement dans le milieu de culture des cellules. Les contrôles négatifs quant à eux, étaient composés de cultures de cellules pures auxquelles ont été ajoutés soit de l'éthanol, soit 0,9 % de NaCl, soit de l'eau (la concentration finale d'éthanol dans le milieu de culture était 2%; 20 μ l de la substance d'essai dissoute dans de l'éthanol ont été ajoutés à 1 ml de la suspension de cellules).

Les tests de viabilité des cellules (test de coloration au bleu Trypan), avant incubation, ont donné des résultats de viabilité de l'ordre de 95 - 99 % pour les deux lignées cellulaires étudiées. Après 30 min d'incubation des cellules avec les substances étudiées, la viabilité des cellules n'a été que très faiblement réduite (80 - 99 %) cependant, on ne pouvait observer aucun effet dû à la concentration des composés étudiés sur la viabilité des cellules.

Les Figures 33 et 34 illustrent l'effet de diverses concentrations de 2-alkylcyclobutanones et de la γ -stéarolactone sur la dégradation des ADN des cellules HT 29 et HT 29 cl19A (test de la comète). L'ordonnée indique le moment de la comète (% de fluorescence dans la queue) qui est un indicateur des dégradations subies par les ADN (ruptures de type simple brins des fragments d'ADN).

Comet Assay on HT 29 stem cells

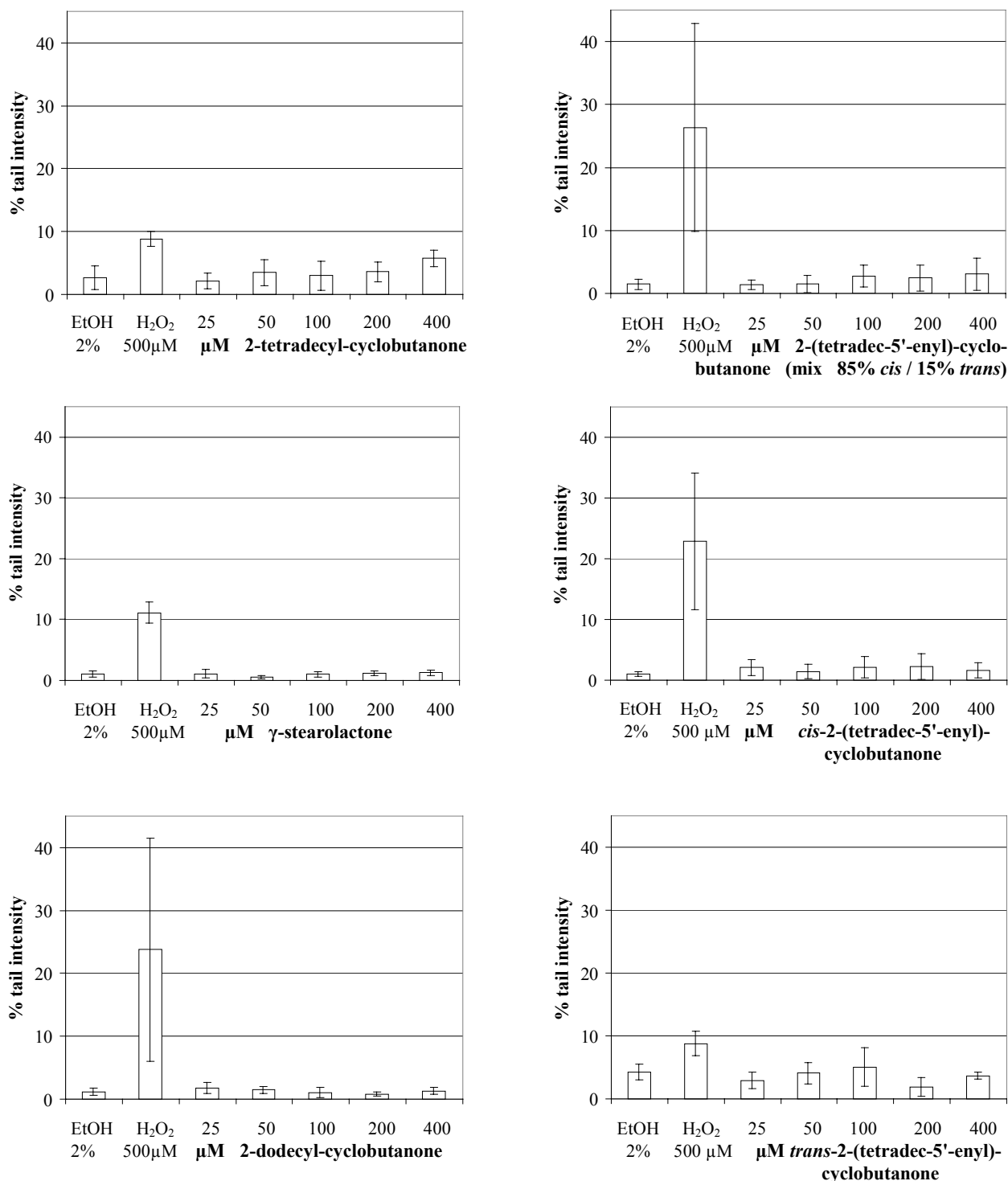


Figure N°33 : Test de la comète réalisé avec les cellules HT 29 après incubation (30 min à 37°C) avec plusieurs 2-alkylcyclobutanones et la γ -stéarolactone à différentes concentrations. (Moyenne +/- SEM, analyses en duplicate, analyse d'au minimum 4-9 lames contenant chacune au moins 50 cellules).

Comet Assay on HT 29 clone 19A cells

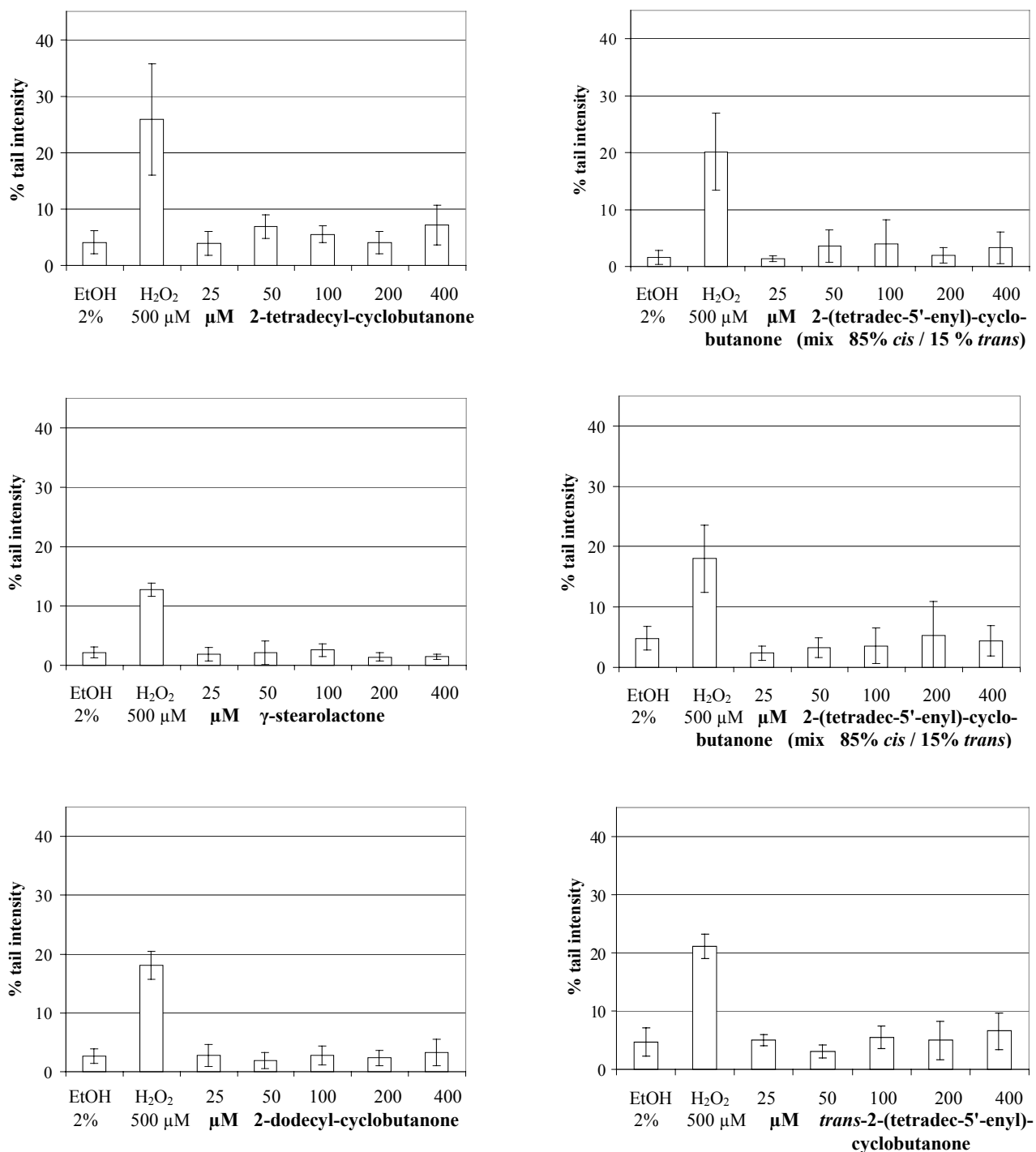


Figure N°34 : Test de la comète réalisé avec les cellules HT 29 clone 19 A après incubation (30 min à 37°C) avec plusieurs 2-alkylcyclobutanones et la γ -stéarolactone à différentes concentrations. (Moyenne +/- SEM, analyses en duplicate, analyse d'au minimum 4-9 lames contenant chacune au moins 50 cellules).

Il n'a pas été possible d'observer un effet dû à la concentration en 2-alkylcyclobutanone ou γ -stéarolactone sur la dégradation des ADN des cellules étudiées.

Bien que la variabilité des résultats obtenus lors de l'analyse des cellules exposées au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , 500 μM) soit importante avec les cellules HT 29, les valeurs obtenues avec les substances d'essai sont significativement inférieures et tout à fait comparables à celles qui ont été obtenues avec le contrôle négatif (2 % EtOH). De même, pour les cellules HT 29 cl 19A, aucune augmentation des lésions dans l'ADN imputable à la présence des 2-alkylcyclobutanones n'a pu être mise en évidence. Il est cependant fort probable que l'utilisation d'une durée d'incubation plus importante permettrait d'observer une augmentation des dégradations des ADN mais certaines difficultés liées à l'apparition d'effets cytotoxiques apparaîtraient. La concentration de 2-alkylcyclobutanones la plus élevée qui ait été testée dans ces expériences était de 400 μM qui correspond à environ 100 $\mu g/ml$. Cette concentration a été imposée par la solubilité limitée de la 2-tDCB et était très inférieure à celle qui avait été utilisée lors des expériences précédentes avec la 2-dDCB, dans lesquelles des concentrations de 300 - 1250 $\mu g/ml$ de 2-dDCB ont été testées (Delincée et Pool-Zobel, 1998). Il est envisagé de réaliser d'autres expériences avec des plus grandes concentrations de 2-dDCB qui présente une solubilité beaucoup plus élevée que la 2-tDCB. Si l'on considère, par exemple dans le cas de l'ionisation de la chair de poulet, qu'environ 0,3 μg 2-dDCB se forment par g de lipides et par kGy absorbé (Stevenson, 1996; Ndiaye *et al.*, 1999), alors il paraît clair que les concentrations de 2-alkylcyclobutanones testées dans ce travail sont très importantes lorsqu'elles sont comparées à celles qui seraient consommées par des humains mangeant des aliments ionisés riches en matières grasses.

Il convient également de noter que le test de la comète n'est qu'un test parmi de nombreux autres essais toxicologiques. Il est bien évident que d'autres techniques réalisées avec d'autres objectifs sont à même de fournir plus d'informations sur le risque potentiel toxique des 2-alkylcyclobutanones. Bien que le test de la comète présente une sensibilité importante pour la détection des propriétés cancérogènes de certains composés, sa spécificité reste cependant incertaine, et cela en partie parce que sa base de données est encore insuffisante (Anderson *et al.*, 1998). Ces auteurs mentionnent également que la signification biologique exacte de la réponse de ce test n'est pas parfaitement claire aujourd'hui. En effet, la part des lésions causées aux ADN et qui ont des conséquences biologiques significatives n'est pas connue avec précision. C'est ainsi que la vitamine C et la rutine flavonoïde se sont avérées positives lors de leur analyse avec le test de la comète, alors que les deux composés sont connus comme ayant des propriétés anticancéreuses. L'analyse par le test de la comète n'a toujours pas été validée et n'a encore fait l'objet d'aucun travail de normalisation aujourd'hui (Tice *et al.*, 2000). D'autres analyses toxicologiques tant *in vitro* que *in vivo*, sont donc nécessaires pour compléter les résultats présentés dans ce rapport, obtenus par le test de la comète.

CONCLUSION

L'utilisation des lignées cellulaires d'origine humaine HT 29 et HT 29 cl 19A lors d'expériences réalisées *in vitro* avec des 2-alkylcyclobutanones et lactone, n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque cyto- ou géno-toxicité de ces composés tant que les durées d'incubation restaient inférieures à 30 min à 37°C. Cependant, ces effets cytotoxiques peuvent être observés lorsque les expérimentations sont réalisées avec des durées d'incubation plus longues (1 - 2 jours) et avec des concentrations des substances d'essai plus élevées ($\geq 50 \mu M$). Il doit être noté que les concentrations de substances d'essai utilisées dans cette étude étaient très élevées, lorsqu'elles sont comparées à celles qui sont ingérées lors de la consommation d'aliments ionisés. D'autres études toxicologiques complémentaires, utilisant d'autres méthodes d'investigation pourront compléter les données scientifiques concernant la connaissance des propriétés des 2-alkylcyclobutanones.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Mesdames S. Vollmer, S. Delincée et R. Lambertz pour leur écoute, leur assistance technique et leurs conseils.

RÉFÉRENCES

Abrahamse, S.L., Rechkemmer, G. (2001), Identification of an organic anion transport system in the human colon carcinoma cell line HT-29 clone 19A, *Pflügers Arch.*, **441**, 529-537.

Anderson, D., Yu, T-W., McGregor, D.B. (1998), Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure, *Mutagenesis*, **13**, 539-555.

Augeron, C., Laboisse, C.L. (1984), Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate, *Cancer Res.*, **44**, 3961-3969.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. (1996), The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Boehringer Biochemica*, **4**, 14-19.

Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J. (1995), The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells, *Mutation Res.*, **336**, 69-77.

Cook, J.A., Mitchell, J.B. (1989), Viability Measurements in Mammalian Cell Systems, *Anal. Biochem.*, **179**, 1-7.

Delincée, H., Pool-Zobel, B.L. (1998), Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat, *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 39-42.

Delincée, H., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G. (1999), Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon. In '5. Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung' (M. Knörr, D.A.E. Ehlermann, H. Delincée, eds.), Karlsruhe, 11-12 Nov. 1998, Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, BFE-R--99-01, 262-260.

Drexler, H.G., Dirks, W., MacLeod, R.A.F., Quentmeier, H., Steube, K., Uphoff, C.C., Eds. (1997), *DSMZ Catalogue of Human and Animal Cell Lines*, 6. Ed., Braunschweig.

Fogh, J., Fogh, J.N., Orfeo, T. (1977), One hundred and twenty seven cultured human tumor cell-lines producing tumors in nude mice, *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 221-226.

Green, L.M., Reade, J.L. and Ware, C.F. (1984), Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, *J. Immunol. Methods*, **70**, 258-268.

Henderson L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998), The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins, *Mutagenesis*, **13**, 89-94.

Horvatovich, P. (2001), Formation des 2-alkylcyclobutanones à partir des triglycérides dans les aliments traités par ionisation. Doctorat de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., Watanabe, M. (1995), Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays Using a Tetrazolium Salt that Produces a Water-Soluble Formazan Dye, *In Vitro Toxicology*, **8**, 187-190.

- Miesch, M., Ndiaye, B., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999), 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs - I. Synthesis of saturated and unsaturated standards, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.
- Miesch, M., Horvatovich, P., Marchioni, E. (2001), Personal communication
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Ndiaye, B., Jamet, G., Miesch, M., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999). 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs – II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 437-445.
- Pool, B.L., Brendler, S.Y., Liegibel, U.M., Tompa, A., Schmezer, P. (1990) Employment of adult mammalian primary cells in toxicology: *In vivo* and *in vitro* genotoxic effects of environmentally significant N-nitrosodialkylamines in cells of the liver, lung and kidney, *Environ. Mol. Mutagen.*, **15**, 24-35.
- Pool-Zobel, B.L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U., Schröder, H.-G., Schmezer, P. (1994) Detection of Genotoxic Effects in Human Gastric and Nasal Mucosa Cells Isolated from Biopsy Samples, *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 23-45.
- Pool-Zobel, B.L. and Leucht, U. (1997) Induction of DNA damage in human colon cells from biopsies by suggested risk factors of colon cancer, *Mutation Res.*, **375**, 105-115.
- Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Schröder, N., Rechkemmer, G. (1999) Anthocyanines are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells, *Eur. J. Nutr.*, **38**, 227-234.
- Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *J. Chromatogr. B*, **722**, 225-254.
- Stevenson, M. H. (1996) Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial. In: *Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status*. McMurray, C., Stewart, E. M., Gray, R. Pearce, J. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 269-284.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F. (2000) Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing, *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 206-221.
- Vosseler, C. (2000) Modulation der DNA-Reparatur in HT 29 clone 19A - Zellen durch β -Carotin. Diplomarbeit, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Wollowski, I. (1998) Untersuchungen zu protektiven Wirkungen von Bakterienmetaboliten auf molekulare Prozesse der Kolonkarzinogenese. Dissertation Universität Gießen, Fachverlag Köhler, Gießen.

2.6.2. Lésions oxydatives de l'ADN produites par les 2-alkylcyclobutanones dans différentes cultures de cellules

Andrea Hartwig et Anke Pelzer

Universität Karlsruhe, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruhe.

INTRODUCTION

Nous avons étudié la formation de lésions oxydatives causées par les 2-alkylcyclobutanones dans l'ADN de lignées cellulaires tumorales humaines HeLa et HT 29. Pour ce faire, nous avons quantifié les fréquences de rupture des brins d'ADN ainsi que les modifications oxydatives de l'ADN incluant la 8-oxo-guanine prémutagène.

La détection des lésions oxydatives dans l'ADN a été effectuée en utilisant une enzyme purifiée, spécifique de la réparation de certaines lésions oxydatives dans l'ADN. Dans notre laboratoire, nous avons établi un protocole permettant de quantifier le nombre de modifications oxydatives des bases de l'ADN grâce à la mesure de la fréquence des lésions reconnues par la formamidopyrimidine-DNA-glycosylase bactérienne (protéine Fpg) en combinaison avec la technique de dénaturation alcaline. (Hartwig *et al.*, 1996). La protéine Fpg est une protéine de réparation bactérienne qui coupe spécifiquement les brins d'ADN au niveau de certaines modifications oxydatives des bases, grâce à une activité endonucléasique associée à son activité glycosydique. La protéine Fpg reconnaît la 8-oxo-guanine, les purines à cycle ouvert de type 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) et de type 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyAde) ainsi que la 8-oxo-adénine avec une moindre efficacité; néanmoins, son affinité est la plus élevée vis à vis de la 8-oxo-guanine que l'on pense être le substrat physiologique principal (Boiteux *et al.*, 1992; Tchou *et al.*, 1991). Pour détecter des lésions Fpg-sensibles de l'ADN après traitement avec les différents 2-alkylcyclobutanones, les monocouches de cellules sont doucement lysées et l'ADN est débarrassé des histones par traitement salin. Ce traitement produit des nucléotides qui sont incubés avec la protéine Fpg. Les ruptures de brins d'ADN résultantes sont déterminées grâce à la méthode de dénaturation alcaline décrite par Ahnström et Erixon (1981). La protéine Fpg nous a été gracieusement fournie par le Docteur Serge Boiteux, (Fontenay aux Roses - France).

Comparé à d'autres approches permettant de mesurer les dégâts oxydatifs de l'ADN comme par exemple la HPLC/ECD ou la GC/MS, notre méthode présente quelques avantages importants. Elle est rapide, demande comparativement une petite quantité de cellules et permet d'étudier environ 40 échantillons en parallèle. De plus, cette méthode est très sensible car elle permet la détection d'environ 500 lésions par cellule, ce qui correspond à environ 5 lésions pour 10^8 bases.

RESULTATS ET DISCUSSION

Choix d'un solvant approprié

Dans une première approche, nous avons recherché un solvant approprié qui n'interfère pas avec l'induction de lésions oxydatives de l'ADN et qui permet de solubiliser les 2-alkyl-cyclobutanones dans le milieu de culture des cellules. Etant donné que l'éthanol avait déjà été utilisé lors des expériences réalisées sur les animaux, nous avons également voulu voir si ce solvant était approprié pour notre étude. Les résultats sont indiqués dans la Figure 35: une solution à 2 % d'éthanol dans le milieu de culture des cellules n'induit pas de lésions oxydatives de l'ADN et n'affecte pas les ruptures de brins d'ADN provoqués par H_2O_2 . Par conséquent, l'éthanol a été utilisé lors de nos études.

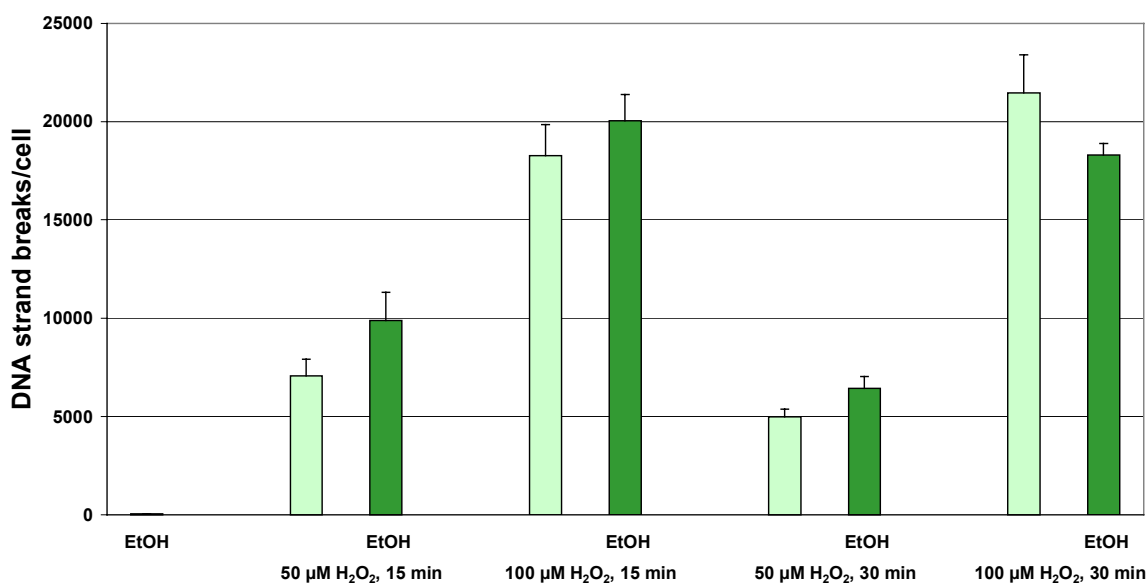


Figure 35 : *Effet d'une solution à 2 % d'éthanol dans le milieu de culture des cellules sur les ruptures de brins d'ADN avec les cellules HeLa. Les ruptures de brins d'ADN causés par l'éthanol seul ou par le mélange éthanol H_2O_2 ont été examinés. H_2O_2 est utilisé comme inducteur de cassures dans l'ADN après 24 heures d'incubation.*

2-Tétradécylcyclobutanone (2-tDCB)

Pour définir une gamme de concentration optimale, la cytotoxicité de la 2-tDCB a tout d'abord été examinée. La capacité à former des colonies est un indicateur sensible qui tient compte de la viabilité à long terme et de la capacité reproductrice des cellules. Des concentrations allant jusqu'à 50 µg/ml de 2-tDCB n'ont pas affecté la capacité à former des colonies. Cependant, des concentrations plus élevées se sont montrées cytotoxiques (Figure 36). Pour ce qui concerne la formation de dommages oxydatifs, on observe, pour les faibles concentrations de produit, une augmentation dose-dépendante des coupures dans l'ADN, tandis que la fréquence des sites Fpg sensibles augmente de façon significative seulement aux concentrations élevées et cytotoxiques.

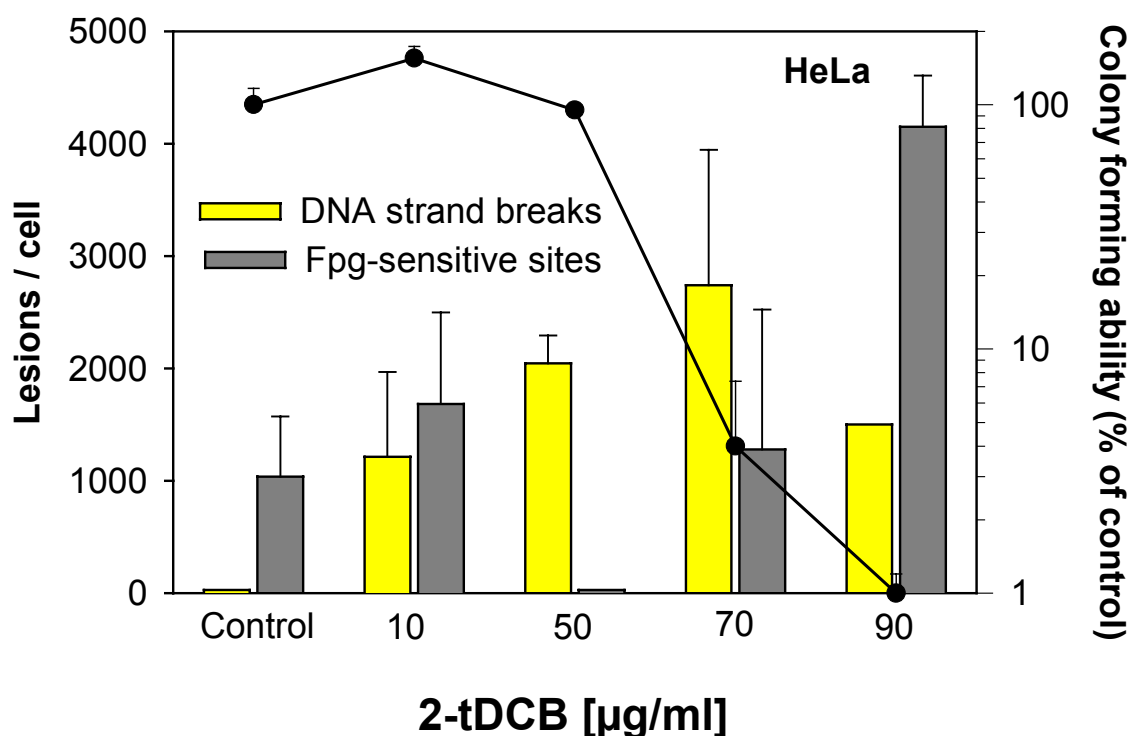


Figure 36 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives dans l'ADN de cellules HeLa, induites par la 2-tDCB après 24 h. Les valeurs moyennes concernant au moins trois mesures des lésions oxydatives de l'ADN + SD (sauf pour une concentration de 90 µg/ml où la valeur moyenne de deux mesures est indiquée) sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

2-Tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB)

Pour étudier l'influence sur la cytotoxicité et (ou) sur l'induction de dégâts oxydatifs de l'ADN d'une double liaison située en position 2 sur la chaîne carbonée des 2-alkylcyclobutanones, nous avons utilisé la 2-tDeCB dérivant de l'acide oléique. Les résultats obtenus montrent (Figure 37) que l'augmentation des ruptures de brins d'ADN et des sites Fpg-sensibles est limitée aux concentrations cytotoxiques.

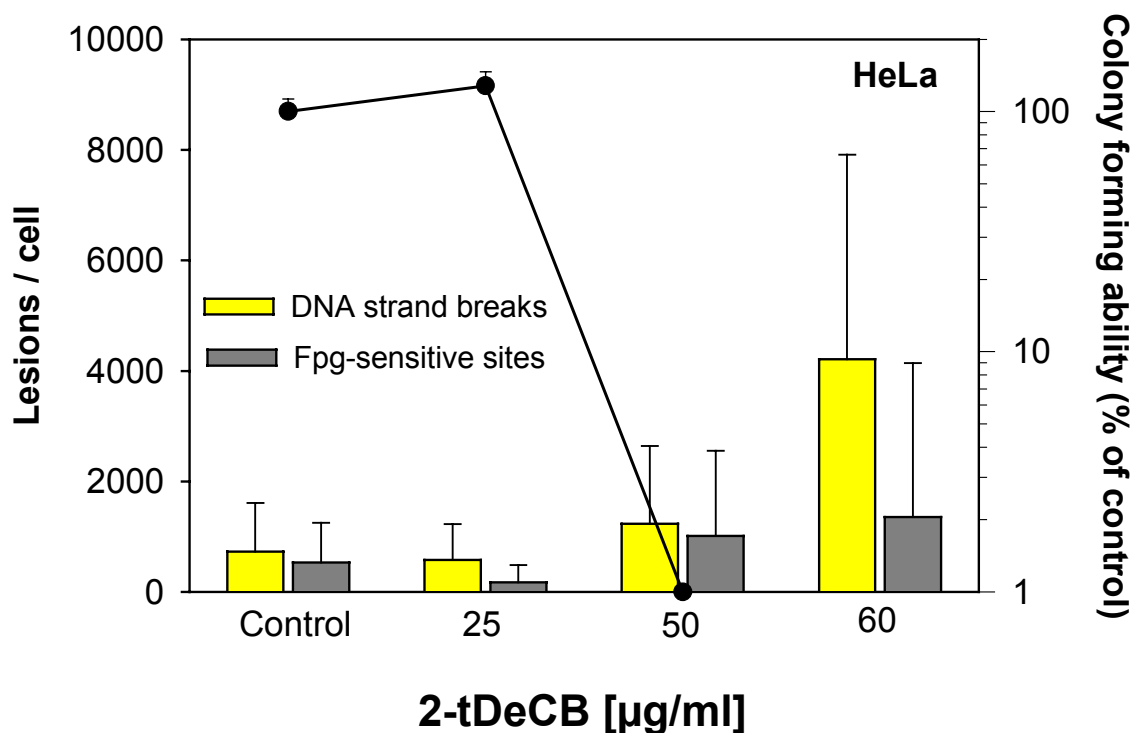


Figure 37 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives dans l'ADN de cellules HeLa, provoquées par la 2-tDeCB après 24 h d'incubation. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

2-Dodécylcyclobutanone (2-dDCB) et 2-Décylcyclobutanone (2-DCB)

Nous avons également étudié l'influence de la longueur de chaîne carbonée des 2-alkylcyclobutanones sur les deux même paramètres, i.e. la cytotoxicité et la formation de lésions oxydatives. Nous avons tout d'abord évalué la 2-dDCB dérivant de l'acide palmitique (Figure 38). Nous avons constaté qu'il y avait une augmentation prononcée de sites Fpg-sensibles et une petite augmentation des ruptures de brins d'ADN en commençant par des concentrations non cytotoxiques comprises entre 10 et 30 µg/ml et en continuant à une concentration de 40 µg/ml. Nous avons obtenu des effets semblables avec la 2-DCB (Figure 39).

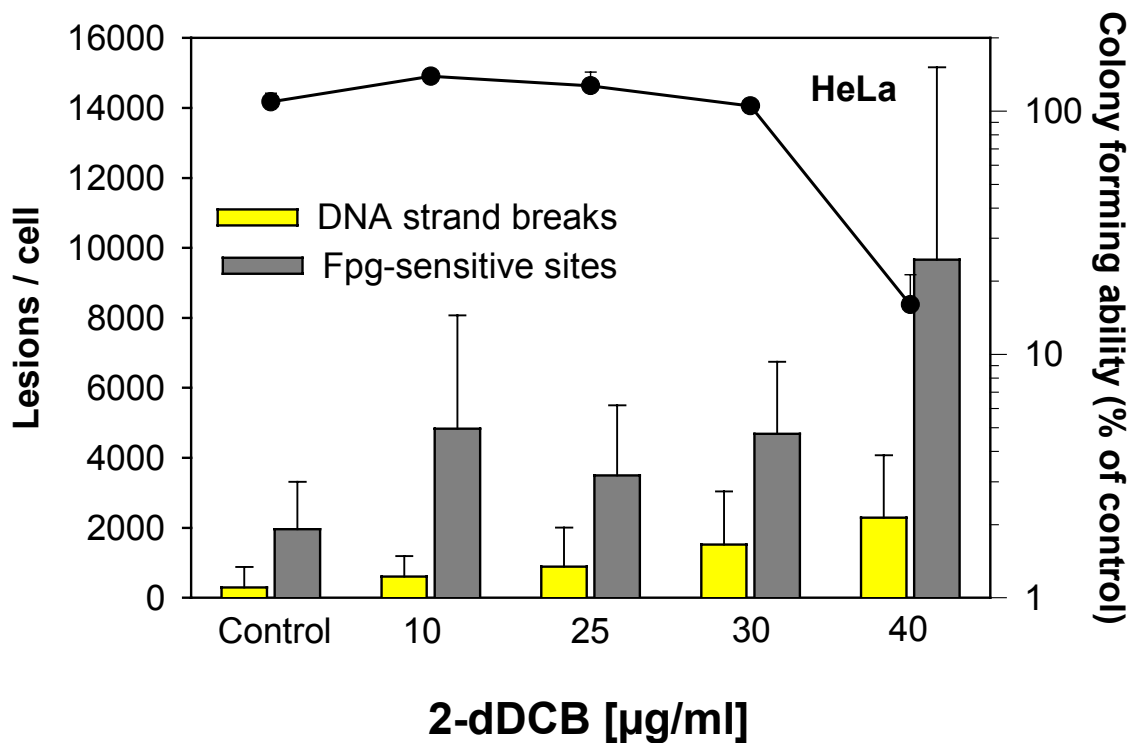


Figure 38 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives dans l'ADN de cellules HeLa, provoquées par la 2-dDCB après 24 h d'incubation. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

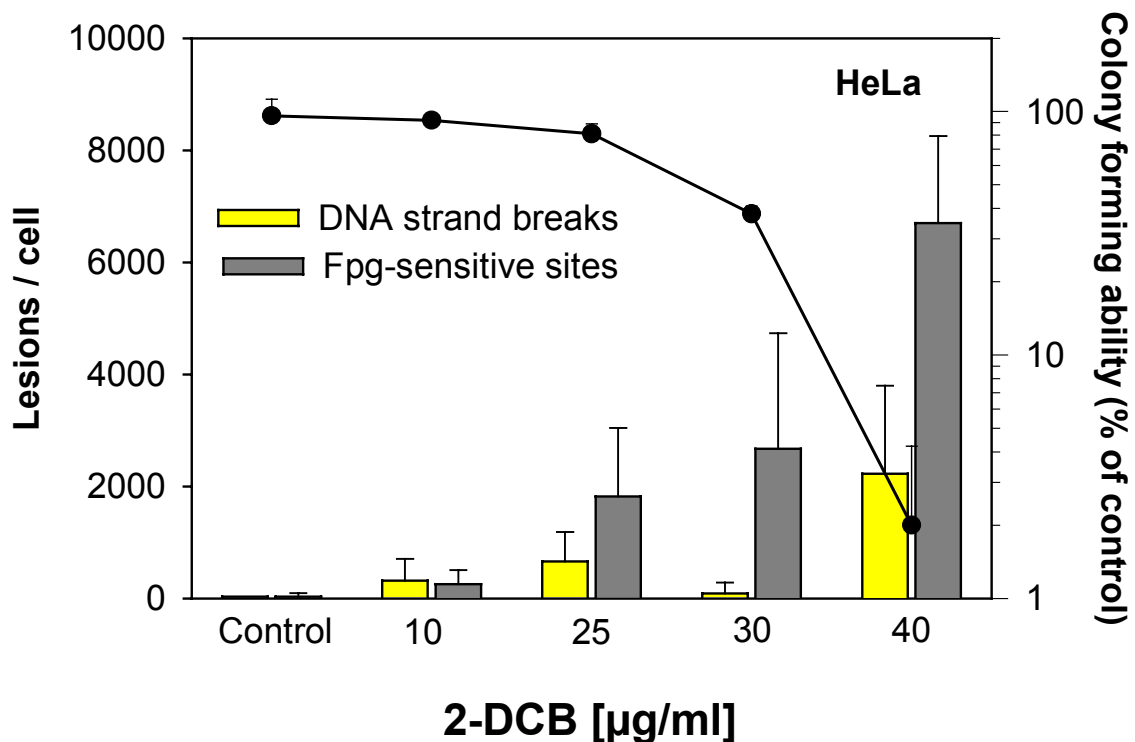


Figure 39 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives dans l'ADN de cellules HeLa, provoquées par la 2-DCB après 24 h. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

γ -Stéaro-lactone (γ -stéaro-L)

Les 2-alkylcyclobutanones obtenues par l'irradiation de la matière grasse contenue dans les aliments peuvent être oxydées en lactones correspondantes. C'est pourquoi, nous avons également étudié la lactone dérivant de l'acide stéarique. Comme indiqué dans la Figure 40, cette lactone provoque également des modifications oxydatives des bases de l'ADN à des concentrations non cytotoxiques.

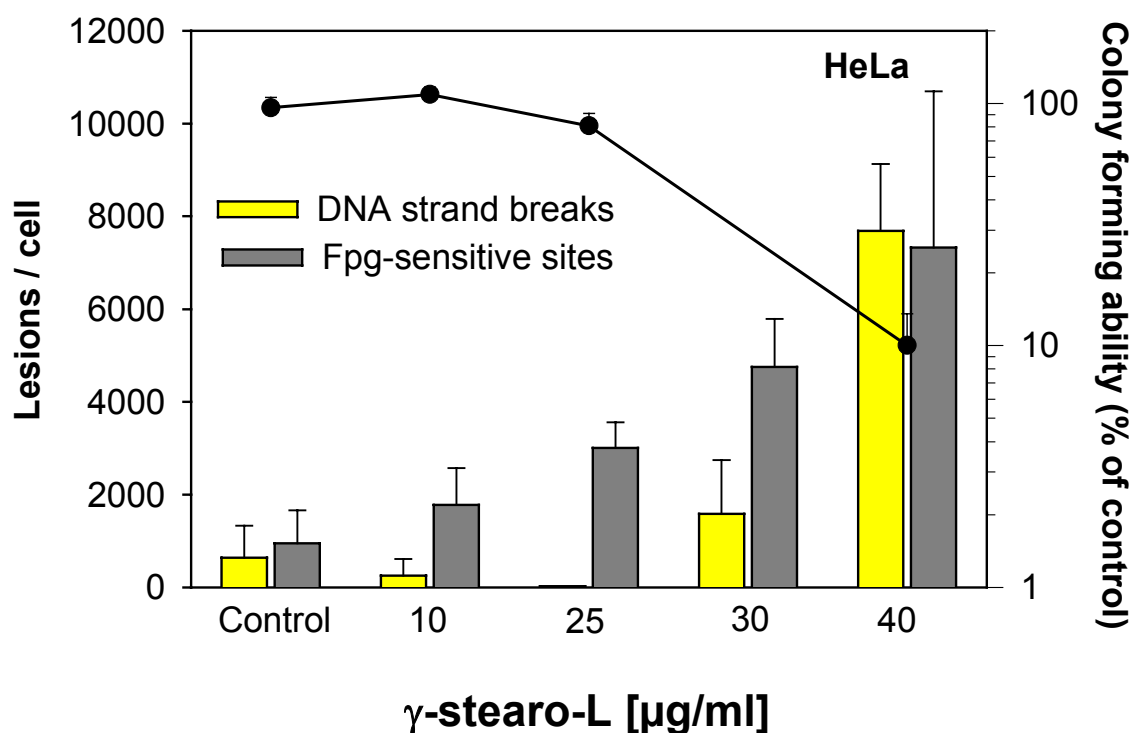


Figure 40 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives dans l'ADN de cellules HeLa provoquées par la 2-stéaric-L après 24 h. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

Jusqu'ici, les expériences ont été effectuées avec des cellules HeLa. Par la suite, nous avons voulu vérifier si une telle modification de l'ADN était également provoquée dans les cellules d'origine différente, en l'occurrence des cellules du tractus digestif. Pour cela, nous avons étudié l'influence de deux composés, à savoir la 2-DCB et la γ -stéarolactone, sur des cellules HT 29, une lignée tumorale de cellules du colon (Augeron et Labois, 1984). Les résultats obtenus montrent que (Figures 41 et 42), au moins dans le cas de la lactone, l'induction de sites Fpg-sensibles est plus marquée comparée à celle observée dans les cellules HeLa.

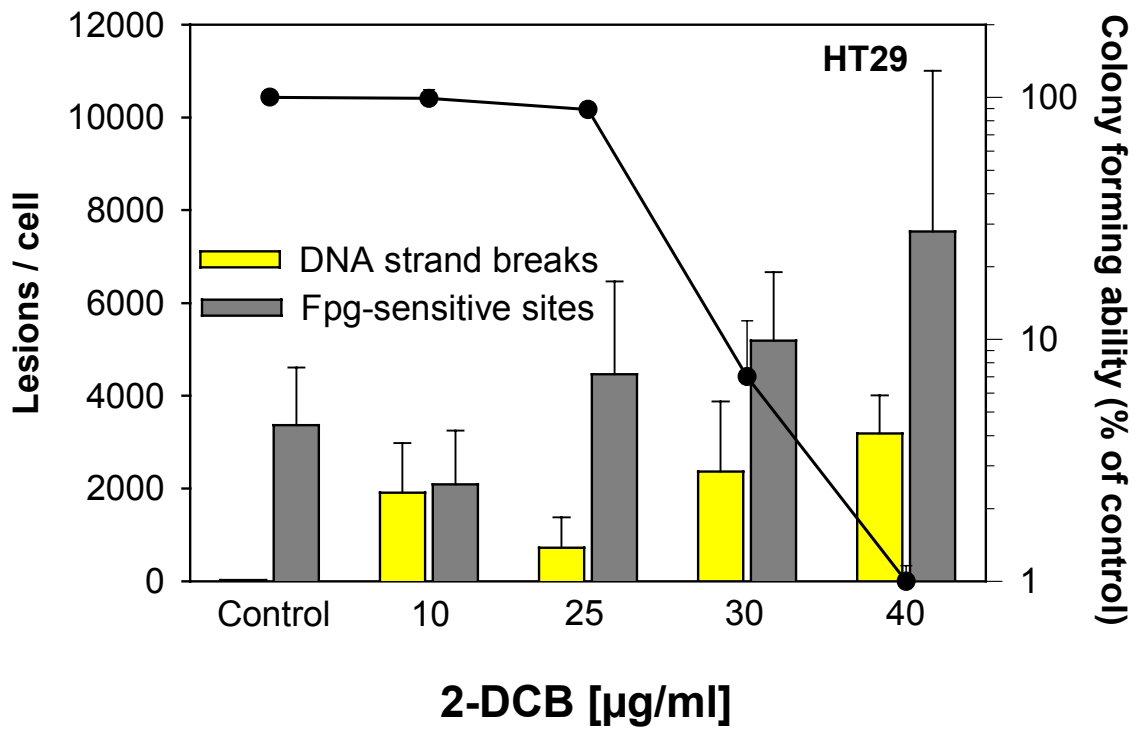


Figure 41 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives de l'ADN de cellules HT29, provoquées par la 2-DCB après 24 h. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

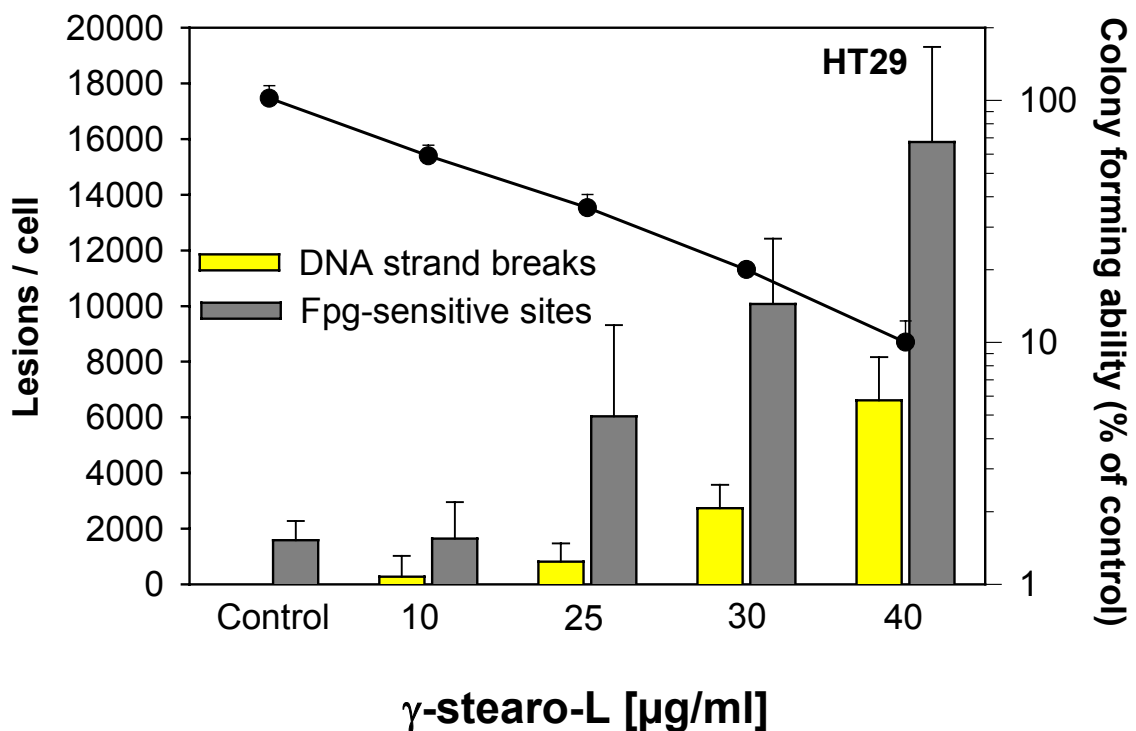


Figure 42 : Cytotoxicité et formation de lésions oxydatives de l'ADN de cellules HT29 provoquées par la γ-t-d-L après 24 h d'incubation. Les valeurs moyennes concernant au moins trois déterminations des lésions oxydatives de l'ADN + SD sont indiquées. Pour la capacité à former des colonies, les données indiquées représentent les valeurs moyennes de six déterminations + SD.

L'ensemble de ces résultats démontre que tous les composés examinés jusqu'ici sont cytotoxiques vis à vis des deux lignées de cellule. Nous avons également montré que les 2-alkylcyclobutanones induisaient la formation de lésions oxydatives dans l'ADN. Cependant, pour les 2-alkylcyclobutanones dérivées respectivement des acides stéarique et oléique, nous avons montré que des lésions oxydatives apparaissaient uniquement à des concentrations très cytotoxiques, concentrations pour lesquelles les cellules ne sont de toute façon pas viables. Cependant, des résultats différents ont été obtenus avec des 2-alkylcyclobutanones dérivées de l'acide palmitique (2-dDCB) ou myristique (2-DCB): les dommages oxydatifs sont observés déjà à des concentrations non cytotoxiques, ce qui a une signification plus importante d'un point de vue toxicologique. Ceci est également vrai pour la lactone (γ -stéarolactone), qui induit de façon importante des lésions oxydatives dans l'ADN des cellules HT 29 mais aussi dans des cellules HeLa.

La pertinence pour la toxicologie humaine des découvertes de cette étude dépendra des quantités réelles de 2-alkylcyclobutanones formées dans la matière grasse des aliments. En outre, il sera important, dans le cas où des lactones se formeraient, de réaliser des études plus détaillées en incluant dans celles-ci des lactones à chaînes plus courtes.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Monsieur M. Chavillie pour son assistance technique.

RÉFÉRENCES

Ahnström, G. and A. Erixon (1981) Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: E.C. Friedberg and P.C. Hanawalt (Eds.) *DNA Repair*. Vol. 1, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, pp. 403 - 418.

Augeron, C. and C. L. Labois (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate, *Cancer Res.*, **44**, 3961 – 3969.

Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization, *Biochemistry*, **31**, 106 - 110.

Hartwig, A., Dally, H. and Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: Use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding, *Toxicology Letters*, **88**, 85 -90.

Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura, S. (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4690 - 4694.

2.6.3. Etude des effets toxicologiques induits par les 2alkylcyclobutanones chez la bactérie

Hélène Titeca, Robert P.P. Fuchs et Dominique Y. Burnouf

Groupe d'Epidémiologie Moléculaire du Cancer, UPR9003 du CNRS (IRCAD), Strasbourg.

INTRODUCTION

Le traitement des aliments par des rayonnements ionisants, qui détruisent la flore pathogène, les parasites et les insectes, est jusqu'à présent considéré comme une méthode efficace et sans risque pour leur conservation. Cependant, ce type d'irradiation conduit aussi à la formation de 2-alkylcyclobutanones, une famille de molécules qui résulte de la radiolyse des triglycérides. Ces composés sont spécifiquement trouvés dans les aliments contenant des graisses et ayant subi une irradiation aux rayons gamma à des fins de conservation. Ils sont de ce fait reconnus comme des marqueurs spécifiques d'irradiation. L'exposition des consommateurs à la famille des 2-alkylcyclobutanones, via la consommation d'aliments ou d'ingrédients irradiés, nécessite de définir un éventuel risque toxicologique lié à ces composés.

MATERIEL ET METHODES

Le 2-Aminofluorène (Sigma St Louis, MI, USA) est dilué dans de l'éthanol pur (Carlo Erba) à 5 ou 10 mg/ml, et la solution est conservée sous Argon Nertal (Air liquide) à -20°C.

Les différentes 2-alkylcyclobutanones ont été synthétisées selon la méthode décrite (Miesch *et al.*, 1999 et 2001) et sont conservées sous argon à -20°C. Lors de leur utilisation, elles sont diluées dans de l'éthanol 100% (Carlo Erba, analytical or HPLC grade).

Le milieu de culture est le Nutrient broth N°2 de chez Oxoid., l'ampicilline de chez Boehringer-Mannheim et les souches de *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 et TA100 ont été obtenues auprès du Laboratoire du Dr B. Ames, Université de Californie, Berkeley, USA.

Les expériences de mutagénèse ont été faites selon les directives publiées par B. Ames et son groupe (Miller *et al.*, 1983, Singer *et al.*, 1983). L'histidine et la biotine, le NADP et le glucose-6-phosphate proviennent de chez Sigma. Le TopAgar de chez Difco. Les fractions S9 ont été achetées auprès de la société Molttox (Boone, NC, USA)

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude des effets biologiques des 2-alkylcyclobutanones (2-ACB) que nous rapportons ici a été conduite en utilisant la bactérie *Salmonella typhimurium*. Les 2-ACB utilisées, 2-tétradécyl- (2-tDCB), 2-dodécyl- (2-dDCB) et 2-décylcyclobutanone (2-DCB), ont été synthétisées selon la méthode décrite précédemment dans ce rapport et leur pureté, supérieure à 98%, contrôlée par GC/MS. La chaîne aliphatique greffée en position 2 du cycle des 2-ACB limite leur solubilité dans les milieux aqueux. Pour les besoins des expériences, ces composés sont solubilisés dans l'éthanol (EtOH), solvant dans lequel elles gardent leurs propriétés physico-chimiques (M. Miesch, communication personnelle).

Effet des 2-alkylcyclobutanones sur la croissance bactérienne.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des 2-ACB sur la croissance bactérienne. Une préculture bactérienne titrée à 10^9 cellules viables par millilitre est utilisée pour ensemencer à un titre final de 10^7 cellules/ml, des solutions de milieu riche supplémenté par les 2-ACB ou le solvant seul, de telle sorte que le titre alcoolique final de la solution de culture soit de 1 ou 2%. Ces cultures sont incubées à 37°C sous agitation et l'avancement de la croissance bactérienne est suivi pendant environ 7 heures par mesure de la densité optique du milieu de culture à 600nm.

Les courbes de croissance montrent un effet dose-dépendant du solvant sur la croissance bactérienne par rapport au contrôle sans EtOH (Figure 43). Une concentration finale de 1% EtOH affecte peu la croissance bactérienne: seul un léger ralentissement est observé après cinq heures d'incubation par rapport au témoin sans éthanol. Par contre, pour une concentration finale de 2%, l'effet est déjà notable après deux heures d'incubation et résulte en une diminution d'un facteur deux de la croissance bactérienne.

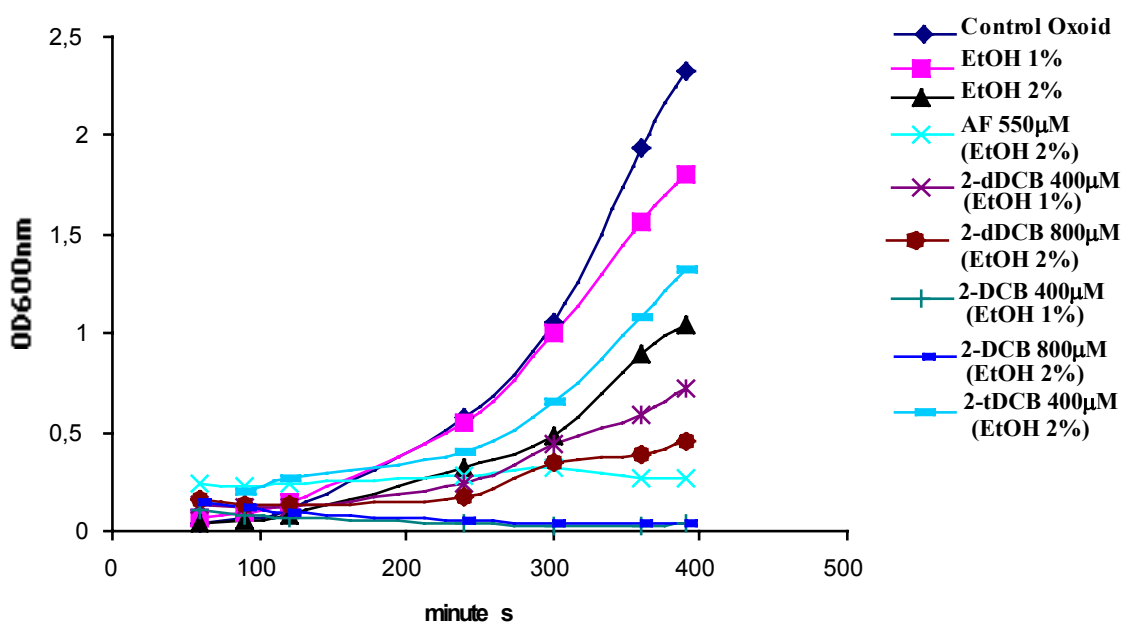


Figure 43: Influence des 2-ACB sur la croissance de TA97. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation, dans un milieu riche (Oxoid Nutrient Broth #2) supplémenté ou non par des concentrations variables de 2-ACB diluées dans de l'éthanol (EtOH 1 ou 2% final). Une mesure de la densité optique à 600 nm est effectuée à intervalles réguliers. Chaque courbe représente la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes.

La courbe de croissance bactérienne observée pour la 2-tDCB (400 µM) n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le contrôle EtOH correspondant (2%), ce qui suggère que la 2-tDCB, à cette concentration, n'ait aucun effet sur la croissance bactérienne, ou que cet effet est suffisamment faible pour être masqué par celui du solvant. De la même façon, la croissance des bactéries traitées par des dérivés proches de la 2-tDCB comme la 2-tétra-décénylcyclobutanone (2-tDeCB) ou la γ -stéarolactone (γ -stéaric-L), n'est pas affectée par rapport au contrôle EtOH correspondant (données non présentées). Par contre, la 2-DdCB provoque un ralentissement très net de la croissance de TA97, puisque le temps de génération de TA97 est doublé entre les contrôles EtOH 1 ou 2% et dDCB 400 ou 800µM respectivement (Tableau 4). L'effet de la 2-DCB est encore plus drastique puisque aucune croissance n'est observée même après 6 heures de culture. De ce fait, il n'a pas été possible de définir le temps de génération des cellules traitées par la 2-DCB.

Ces résultats indiquent que pour nos conditions expérimentales, deux des produits testés, la 2-dDCB et la 2-DCB présentent un effet inhibiteur de la croissance bactérienne. Néanmoins, pour les longues incubations, au-delà de 24 heures, il apparaît que la vitesse de croissance des bactéries traitées par la 2-tDCB et la 2-dDCB s'accroît pour se rapprocher de celle du témoin (données non présentées). Ceci suggère que ces produits présentent une activité cytotoxique ou cytostatique.

Tableau 4: Détermination du temps de génération de *S. typhimurium* TA97 cultivée dans un milieu de croissance supplémenté avec différentes 2-alkylcyclobutanones.

Cultures	temps de génération minutes	Facteur de proportionnalité par rapport au contrôle éthanol correspondant
Témoin Oxoid	50	
Control EtOH 1%	75	
Control EtOH 2%	100	
2-tDCB (400 µM)	100	1 (EtOH 2%)
2-dDCB (400 µM)	150	2 (EtOH 1%)
2-dDCB (800 µM)	235	2-2,5 (EtOH 2%)
2-DCB (400 µM)	nd	
2-DCB (800 µM)	nd	

nd: non déterminé

Effet dose-réponse de la concentration de 2-ACB sur la croissance bactérienne.

L'analyse de la croissance bactérienne a été réalisée en fonction de la concentration de 2-DCB et de 2-dDCB (Figure 44a et b). Une concentration de 4 µM de 2-dDCB (Figure 44b) n'affecte pas la croissance bactérienne tandis que des concentrations 10 ou 100 fois supérieures retardent efficacement cette croissance. En ce qui concerne la 2-DCB (Figure 44a), une concentration de 4 µM apparaît aussi efficace que 40 µM de 2-dDCB, tandis que des concentrations plus élevées limitent la croissance bactérienne à un niveau très faible.

A titre de comparaison, nous avons introduit dans l'expérience un contrôle où les bactéries sont traitées dans les mêmes conditions par une solution alcoolique de 2-aminofluorène (2-AF). Cette amine aromatique est un procancérigène modèle qui conduit, après métabolisation *in vivo*, à la formation d'intermédiaires réactifs qui vont se fixer de façon covalente sur l'ADN et induire des mutations. *In vivo*, ce produit est cytotoxique et mutagène chez les bactéries et il induit chez le rat des cancers du foie (Singer *et al.*, 1983, Miller *et al.*, 1983). Dans le cas présent, les cellules traitées par le 2-AF voient leur croissance ralentie selon la concentration utilisée (Figure 44a et b). Si l'on compare les toxicités propres de l'aminofluorène et des décyl- et dodécylcyclobutanones, et ce compte tenu des concentrations utilisées, il apparaît que la 2-DCB est au moins 30 fois plus toxique que le 2-AF (Figure 44a), et la 2-dDCB environ 5 fois (Figure 44b).

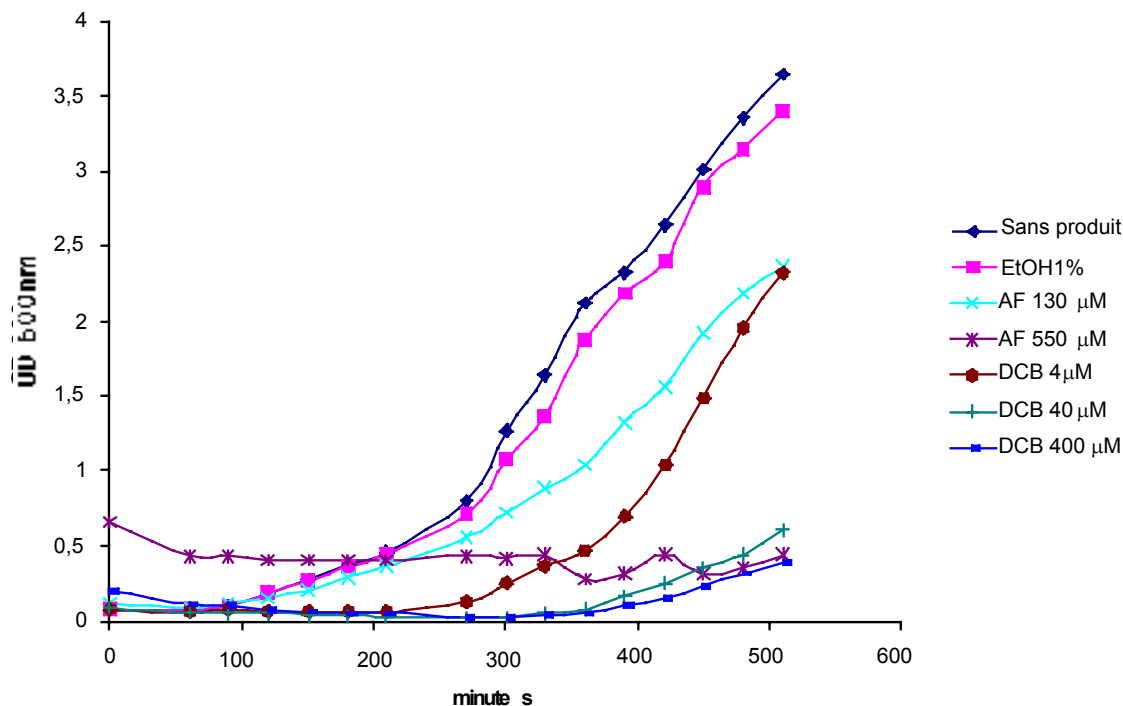


Figure 44a: Effet de différentes concentrations de 2-DCB sur la croissance de TA97. Tous les produits analysés sont solubilisés dans de l'EtOH 1%.

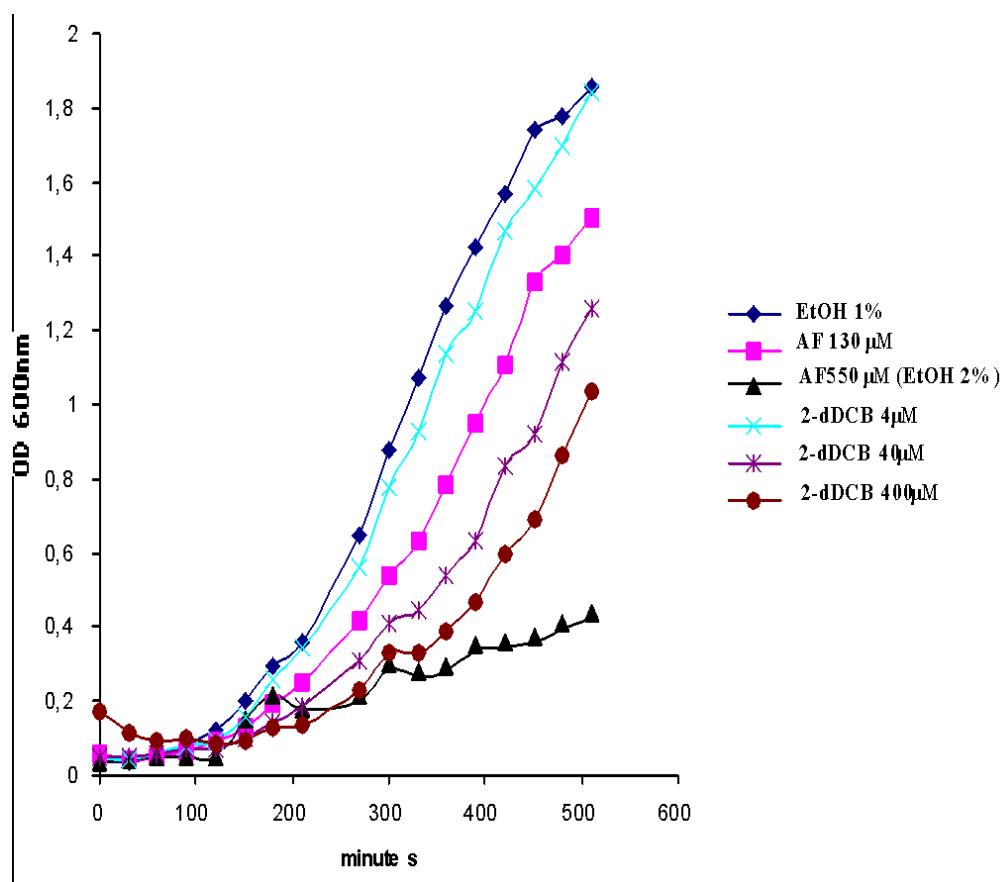


Figure 44b: Effet de différentes concentrations de 2-tDCB sur la croissance de TA97.

Ceci indique aussi que la 2-DCB est plus toxique que la 2-dDCB. Cette toxicité relative de la 2-DCB par rapport à la 2-dDCB est estimée dans la Figure 45. Dans cette analyse, les valeurs de densité optique de chaque courbe sont normalisées par rapport au témoin EtOH, et le rapport R des valeurs obtenues pour la 2-DCB et la 2-dDCB est tracé en fonction du temps. Les courbes obtenues pour les contrôles 2-AF sont plates, ce qui valide l'approche car le même

produit doit induire le même effet dans les deux expériences. Les courbes visualisant le rapport des deux 2-alkylcyclobutanones, pour chaque concentration, présentent un aspect en cloche dont l'acmé représente le différentiel de croissance maximal entre les deux cultures. D'après les trois courbes, on peut définir un différentiel moyen de 10. Autrement dit, l'effet inhibiteur de la 2-DCB serait 10 fois plus important que celui de la 2-dDCB. Cette estimation est corroborée par l'étude de la survie des bactéries exposées à ces produits, et décrite ci-après.

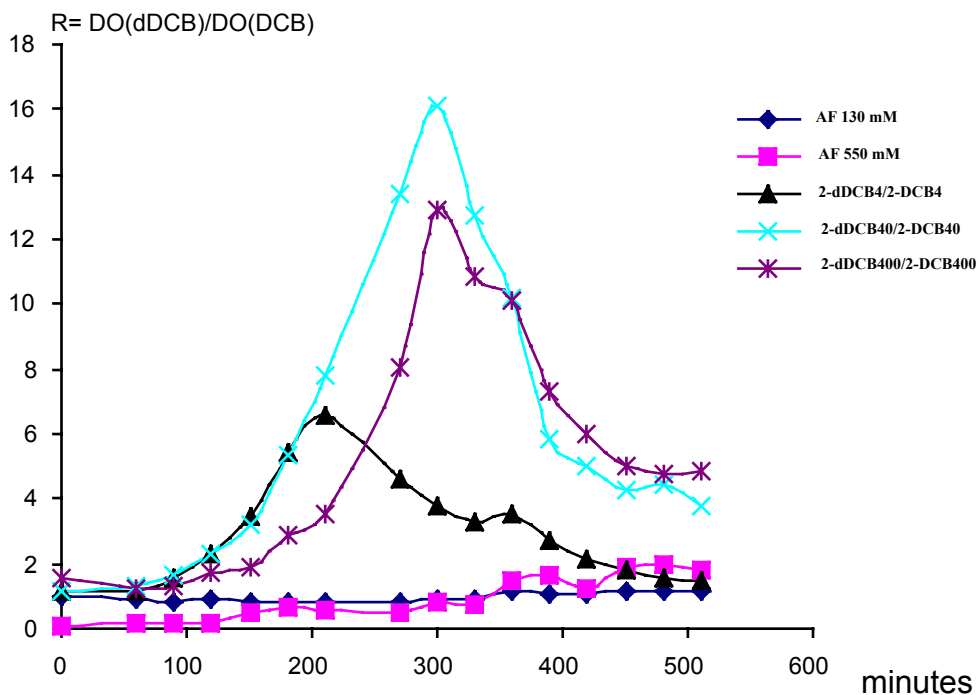


Figure 45: Evolution du rapport R en fonction du temps.

Etude de la survie.

Compte tenu de l'action des 2-ACB sur la croissance bactérienne, il est nécessaire de déterminer s'il s'agit d'un effet cytostatique ou cytotoxique. Pour ce faire, des cultures sont traitées par les différentes 2-ACB, et des aliquots sont prélevés, étalés sur milieu gélosé et incubés 20 heures à 37°C. Le dénombrement des clones par rapport au contrôle non traité, permet de mesurer l'effet toxique des produits.

Une expérience préliminaire étudiant les pourcentages de survie en fonction des temps d'incubation (Figure 46) montre que la 2-tDCB ne présente aucun effet toxique, en accord avec les conclusions des analyses de croissance bactérienne (Figure 43). Par contre la 2-DCB et la 2-dDCB diminuent la survie des bactéries, et ce d'autant plus que le temps d'incubation augmente. Là encore, il est intéressant de remarquer que la survie des bactéries traitées par la 2-DCB est approximativement 10 fois plus faible que celle des cellules traitées par la 2-dDCB, ce qui conforte les analyses de la Figure 45.

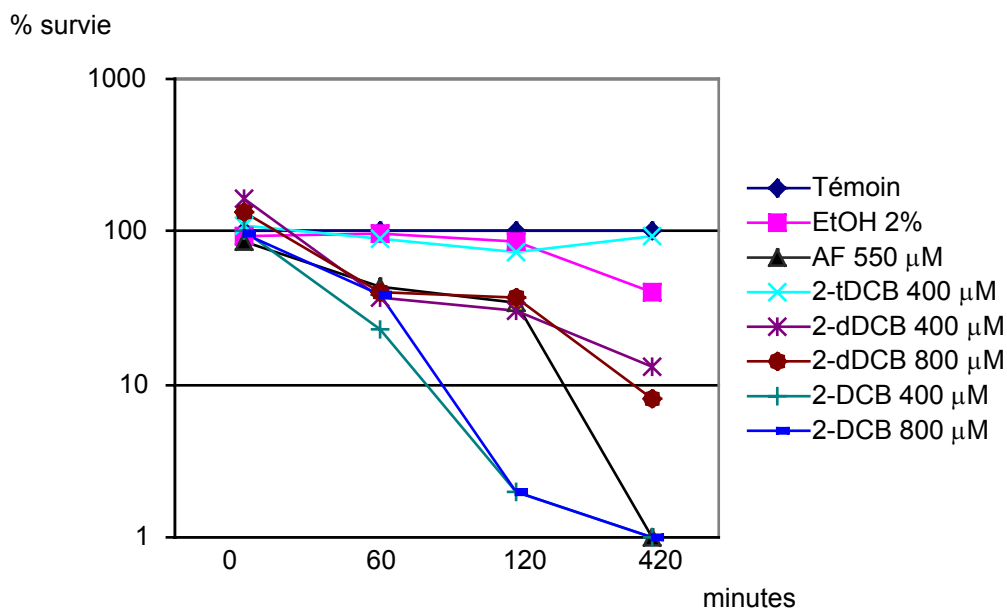


Figure 46: % de survie de TA97 traitée par différentes 2-ACB, à différentes concentrations, en fonction du temps.

Cette étude de la survie permet aussi de définir les concentrations minimales pour lesquelles un effet toxique est observé. Selon la loi de Poisson, qui modélise la probabilité pour des événements rares de se produire, le 37% de survie identifie la concentration de produit pour laquelle survient un événement létal. Ainsi en portant les pourcentages de survie en fonction des concentrations de 2-ACB (Figure 47), cette valeur de 37% est obtenue pour environ 4 μM de 2-DCB, 40 μM de 2-dDCB. La concentration de 2-tDCB nécessaire est au-delà de 400 μM , c'est à dire bien supérieure à la solubilité du produit. Là encore on retrouve un facteur 10 de toxicité entre la 2-DCB et la 2-dDCB.

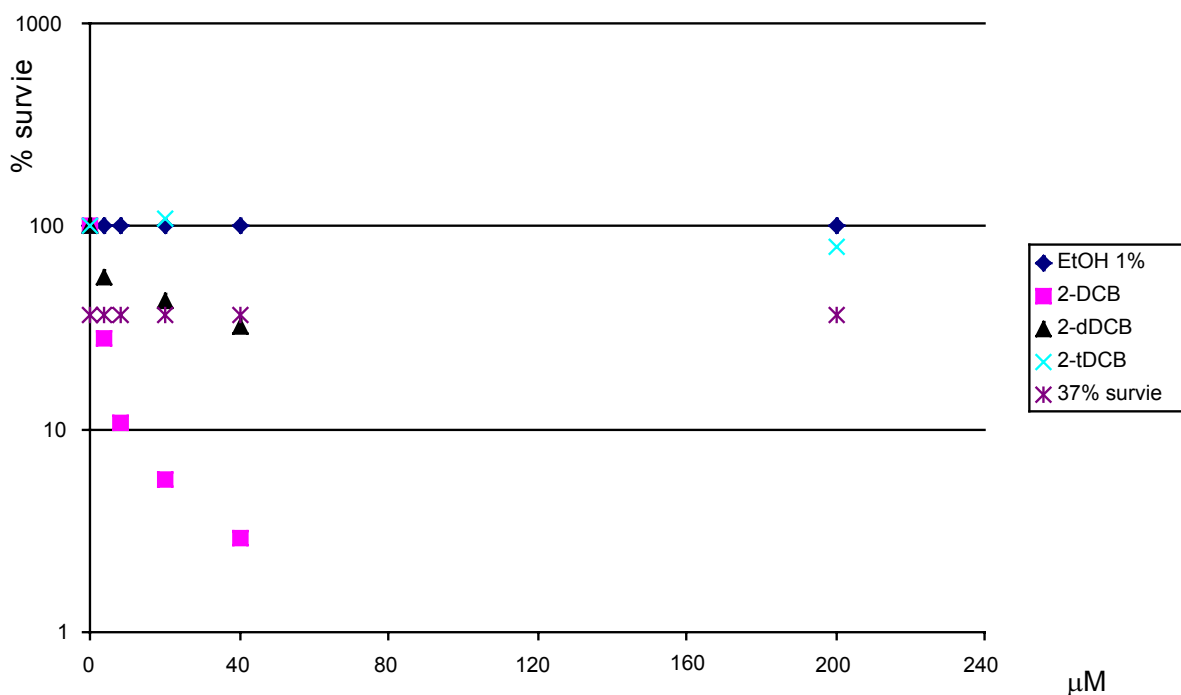


Figure 47: Estimation du 37% de survie de TA97 traitées par différentes 2-ACB en fonction de la concentration.

Ces expériences démontrent donc que certaines alkylcyclobutanones ont une activité cytotoxique sur les bactéries. D'autre part, elles suggèrent que l'amplitude de cet effet cytotoxique soit liée à la longueur de la chaîne alkyle.

Etude de la mutagénèse induite par les 2-ACB.

Un des objectifs de cette étude était de définir si les 2-ACB présentaient des propriétés mutagènes. Nous avons utilisé le Test d'Ames (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983) qui est une méthode de criblage utilisée en routine pour identifier les molécules ayant des propriétés mutagènes. Ce test repose sur l'utilisation d'une série de bactéries *Salmonella typhimurium* possédant chacune une mutation ponctuelle de nature différente (mutation de substitution, par décalage +1 ou +2 du cadre de lecture) inactivant l'un des gènes impliqués dans la chaîne de biosynthèse de l'histidine. De ce fait, ces bactéries sont auxotrophes pour cet amino-acide, c'est à dire qu'elles sont incapables de se développer en absence d'histidine. Lorsque ces bactéries sont soumises à l'action d'agents mutagènes, la mutation d'auxotrophie peut être révertée, soit par substitution, soit par décalage -1 ou -2 du cadre de lecture, conférant ainsi un caractère prototrophe pour l'histidine (c'est à dire que la bactérie peut se développer en absence d'histidine dans le milieu). Selon la ou les souches qui peuvent être révertées, on peut définir la spécificité de mutation du mutagène étudié.

De nouveau, nous avons utilisé le 2-aminofluorène, dont les propriétés mutagènes ont été bien étudiée par le test d'Ames (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983), comme mutagène contrôle. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 5. Il apparaît que le nombre de révertants spontanés par boîte (sans produit) est en accord avec les résultats publiés précédemment (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983), bien que la seconde expérience avec TA97 donne des nombres un peu élevés. De la même façon les expériences conduites avec le 2-AF donne des nombres de révertants en accord avec les valeurs publiées (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983), ce qui valide nos expériences. Par contre, aucune des 2-ACB testée n'apparaît capable de réverter les mutations d'auxotrophie dans aucune des souches utilisées, et ce aussi bien en absence qu'en présence de fraction microsomale de foie de rat. Ces résultats sont en accord avec un travail effectué par deMeester et Leonard en 1992, et qui montrait, dans le même type de test, une absence de mutagénèse induite par la 2-dDCB. S'il semble acquis que ces produits ne sont pas des mutagènes directs, puisqu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de révertants en absence de fraction S9, cela ne signifie pas pour autant que ces molécules ne possèdent pas des propriétés mutagènes. Il est possible que les enzymes nécessaires à l'activation des 2-ACB ne soient pas présentes dans les fractions S9, ou que le mécanisme d'induction des mutations suive un processus différent, par exemple la voie oxydative, qui n'est pas mis en évidence dans le test pratiqué ici. Dans cette perspective, il est intéressant de remarquer qu'un de nos collègues a mis en évidence l'induction de sites sensibles à la Fapy glycosylase: parmi les lésions reconnues par cette enzyme de réparation, on retrouve effectivement des lésions oxydatives. D'autre part, l'observation faite in vivo par le groupe de F. Raul sur des rats traités par la 2-tDCB ou la 2-tDeCB et montrant un effet à tout le moins promoteur de ces produits dans les processus de cancérogénèse du côlon, laisse à penser que ces produits pourraient présenter une activité génotoxique.

Tableau 5 : Analyse du pouvoir mutagène des 2-alkylcyclobutanones par le test d'Ames.

Souches	TA97		TA98		TA100	
Mutation révertante	-C		-CG		G→T	
Réversion spontanée attendue (clones/boîte)	90-180		30-50		120-200	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
2-DCB						
0,4 µM	307	321	26	39	204	191
1 µM	314	317	30	32	162	162
2 µM	336	432	28	29	183	174
4 µM	147	262	27	40	161	177
	133	365			177	167
					176	164
40 µM	207	264	32	43	160	212
	133	360			187	174
					188	199
2-dDCB						
4 µM	174	241	37	34	172	152
	133	339			154	183
40 µM	155	203	37	49	160	172
	133	293			171	177
					167	178
2-tDCB						
40 µM	184	218	36	42	158	159
	133	300			207	189
400 µM	172	228	34	32	146	160
	316	277			174	183
					175	184
Sans Produit						
	134	188	36	36	167	172
	294	286			143	196
					162	187
2-AF						
55 µM	168	595	33	1824	158	371
	260	826			190	698
550 µM	130	1636	138	5736	184	3476
	342	1654			184	3128
					159	2936

Les nombres de clones présentés sont la moyenne de trois boîtes

CONCLUSION

Cette étude a montré que certaines 2-alkylcyclobutanones présentaient une activité cytotoxique sur les bactéries *S. typhimurium*. La dose toxique pour la 2-DCB est d'environ 4 µM (1µg/ml) alors qu'elle est dix fois plus élevée pour la 2-dDCB. L'amplitude de cette activité semble liée à la longueur de la chaîne carbonée: la 2-DCB présente en effet une toxicité dix et cent fois plus importante que la 2-dDCB et la 2-tDCB, dont les chaînes carbonées portent deux ou quatre atomes de carbone supplémentaires, respectivement. Actuellement, la base de cette cytotoxicité n'est pas connue. Enfin, bien que des effets génotoxiques aient pu être mis en évidence *in vitro*, par le test de la comète (Delincée *et al.*, 1998) ou par l'apparition de sites sensibles à l'enzyme de réparation Fpg (voir le travail du groupe du Dr Hartwig dans ce rapport), aucune activité mutagène des 2-ACB n'a pu être démontrée en utilisant le test d'Ames.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Madame Francine Exinger, Monsieur Bernard Hezard de Aérial et Monsieur le Professeur Guy Dirheimer pour leur écoute et leurs conseils.

RÉFÉRENCES

Ames B.N., Cann J.Mc, Yamasaki E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutation Research*, **31**, 347-361.

Delincée H., Pool-Zobel B.L. (1998) Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat, *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 1-6.

Maron D.M., Ames B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173-215.

Miesch M., Ndiaye B., Hasselmann C. and Marchioni E. (1999) 2-alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. 1. Synthesis of saturated and unsaturated standards, *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.

Miesch M., Horvatovich P., Raul F., Burnouf D., Delincée H., Hartwig A., Werner D., Marchioni E. (2001) Efficient reaction pathway for the synthesis of saturated and monounsaturated 2-alkylcyclobutanones, *in preparation*.

Miller J.A. and Miller E.C. (1983) Some historical aspects of N-aryl carcinogens and their metabolic activation, *Environ. Health Perspect.*, **49**, 3-12.

Singer B. and Grunberger D. Eds. (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum press, New York.

2.6.4. Incidence de la 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB) et de la 2-tétradécénylcyclobutanone (2-tDeCB) sur la cancérogenèse intestinale chez le rat

Francis Raul

Laboratoire du Contrôle Métabolique et Nutritionnel en Oncologie Digestive
Université Louis Pasteur, Strasbourg.

L'objectif de nos travaux a été de déterminer si les 2-tDCB et/ou la 2-tDeCB présentes dans les aliments ionisés sont des agents capables de favoriser le développement du cancer du côlon chez des rats traités par un cancérigène chimique.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX (FIGURE 48)

Les expérimentations sont réalisées avec des rats mâles de la souche Wistar ayant un poids moyen initial de 260-270 g (n=36), et placés dans des conditions standards (22°C; humidité de 60%; cycle jour-nuit de 12h, 20 cycles de renouvellement d'air par heure). Les rats sont séparés de façon aléatoire en 6 groupes comprenant chacun 6 rats. Les rats sont alimentés *ad libitum* avec le même régime alimentaire dans des conditions isocaloriques (UAR A04, Villemoisson/Orge, France).

L'alimentation des rats n'a pas été ionisée. Elle est composée de 16% de protéines (caséinates et protéines de poissons), 60% de glucides (amidon de maïs), 3% de lipides (huiles de soja et de poissons), 6% de minéraux, et 1% de vitamines. La composition en acides gras est de: 2,6 mg·g⁻¹ d'acide palmitique, 0,5 mg·g⁻¹ d'acide stéarique, 8 mg·g⁻¹ d'acide oléique, et 14,5 mg·g⁻¹ d'acide linoléique.

Les quatre groupes expérimentaux reçoivent quotidiennement à 17:00 h de l'eau de boisson contenant soit de la 2-tDCB, soit de la 2-tDeCB à la concentration finale de 0,005% (poids/volume) dans de l'éthanol à 1%. Les deux groupes contrôles reçoivent de l'eau de boisson contenant de l'éthanol à 1%. La quantité de boisson consommée est mesurée quotidiennement. La consommation moyenne de 2-tDCB ou de 2-tDeCB correspond à environ 1 mg par jour et par rat. Le poids corporel des animaux est mesuré régulièrement une fois par semaine tout au long de la période expérimentale. Après une période initiale de 2 semaines, tous les rats reçoivent une injection intrapéritonéale d'azoxyméthane (AOM) (15 mg/kg) par semaine pendant 2 semaines (semaines 3 et 4). L'AOM est un cancérigène chimique induisant sélectivement l'apparition de lésions pré-cancéreuses au niveau du côlon 3 à 5 semaines après la fin des injections, des adénomes (polypes) apparaissent 4-6 mois après la dernière injection d'AOM et des tumeurs macroscopiques (adénomes et adénocarcinomes) sont présentes environ 10-12 mois après traitement avec l'AOM (Druckrey, 1970; Pereira *et al.* 1994).

Quinze semaines après l'initiation de l'expérimentation, soit 11 semaines après la dernière injection d'AOM, les animaux d'un des deux groupes contrôles (n=6), d'un groupe 2-tDCB (n=6) et d'un groupe 2-tDeCB (n=6) sont sacrifiés. A cette période les lésions préneoplasiques peuvent être facilement quantifiées à la surface de la muqueuse du côlon. Les animaux des autres groupes (un groupe contrôle et deux groupes expérimentaux) sont sacrifiés 27 semaines après le début de l'expérimentation (soit 23 semaines après la dernière injection d'AOM).

Le côlon est prélevé et rincé dans du NaCl 0,9%. Après ouverture longitudinale le segment colique est épinglé à plat sur de la paraffine, fixé dans de la formaline à 10% et coloré avec du bleu de méthylène à 0,2% pendant 5 min. Après lavage dans une solution de Krebs-Ringer le nombre et la taille des foyers cryptiques pré-neoplasiques et des tumeurs présentes à la surface de la muqueuse (par cm) sont déterminés au microscope à un grossissement de 40X (nombre total déterminé sur 5 cm) (Bird, 1987; Metz *et al.* 2000).

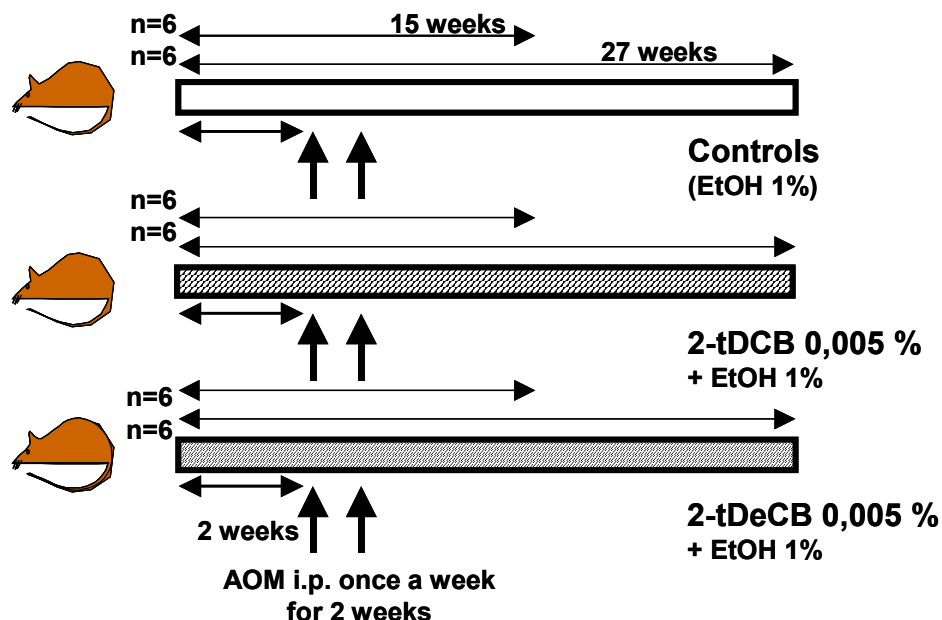


Figure 48 : *Protocole expérimental.*

RESULTATS ET DISCUSSION

Les rats ayant ingérés des 2-tDCB et 2-tDeCB à la concentration de 0,005% ne présentent aucune altération de leur poids corporel (Tableau 6) par rapport aux témoins pendant toute la durée de l'expérimentation. Ceci démontre que ces composés n'exercent aucun effet toxique apparent.

Tableau 6 : *Evolution pondérale des animaux (g).*

Groupes	Poids initial	15 semaines	27 semaines
Contrôle	261 ± 5	569 ± 14	677 ± 19
+ 2-tDCB	268 ± 5	577 ± 19	680 ± 13
+ 2-tDeCB	270 ± 6	588 ± 20	707 ± 29

Comme présenté dans le Tableau 7, le nombre total de foyers cryptiques pré-néoplasiques (par cm de colon) est semblable dans tous les groupes 11 semaines après la dernière injection d'AOM. Ces résultats indiquent qu'à cette période du traitement, ni la 2-tDCB, ni la 2-tDeCB n'augmentent le nombre total des lésions précancéreuses induites par l'AOM au niveau du côlon. Cependant, à un stade plus tardif soit près de 27 semaines (23 semaines après traitement par l'AOM qui a eu lieu durant la semaine 4), une augmentation significative (+ 80%) du nombre de lésions pré-néoplasiques (cryptes hyper-prolifératives) est mise en évidence chez les rats recevant la 2-tDeCB. Dans le groupe recevant la 2-tDCB le nombre total de lésions précancéreuses est également augmenté d'environ 20% comparé aux contrôles (Tableau 7). Le nombre de foyers préneoplasiques (ACF par cm) est également plus important dans le côlon des rats recevant de la 2-tDCB ou de la 2-tDeCB, cependant cette augmentation n'est pas statistiquement significative par rapport aux rats du groupe contrôle.

Tableau 7 : Lésions précancéreuses dans la muqueuse du côlon.

Groups	Number of aberrant crypt foci per cm		Total number of aberrant crypts (5 cm of colon)	
	15 weeks	27 weeks	15 weeks	27 weeks
Controls	18 ± 2	14 ± 2	253 ± 24	218 ± 39 ^a
+ 2-tDCB	17 ± 3	17 ± 2	221 ± 58	261 ± 42 ^a
+ 2-tDeCB	20 ± 3	19 ± 2	260 ± 32	394 ± 37 ^b

a≠b, p<0,05

La Figure 49 montre que les rats recevant de la 2-tDeCB ont un nombre plus élevé de cryptes pré-néoplasiques par foyer cryptique, 27 semaines (23 semaines après traitement par l'AOM), comme l'illustre le nombre plus important de foyers formés par plus de 4 cryptes précancéreuses. Ceci est également le cas, mais dans une moindre mesure chez les rats recevant la 2-tDCB.

Ces résultats sont importants car les foyers cryptiques pré-néoplasiques de grande taille présentent une plus forte probabilité d'évolution tumorale.

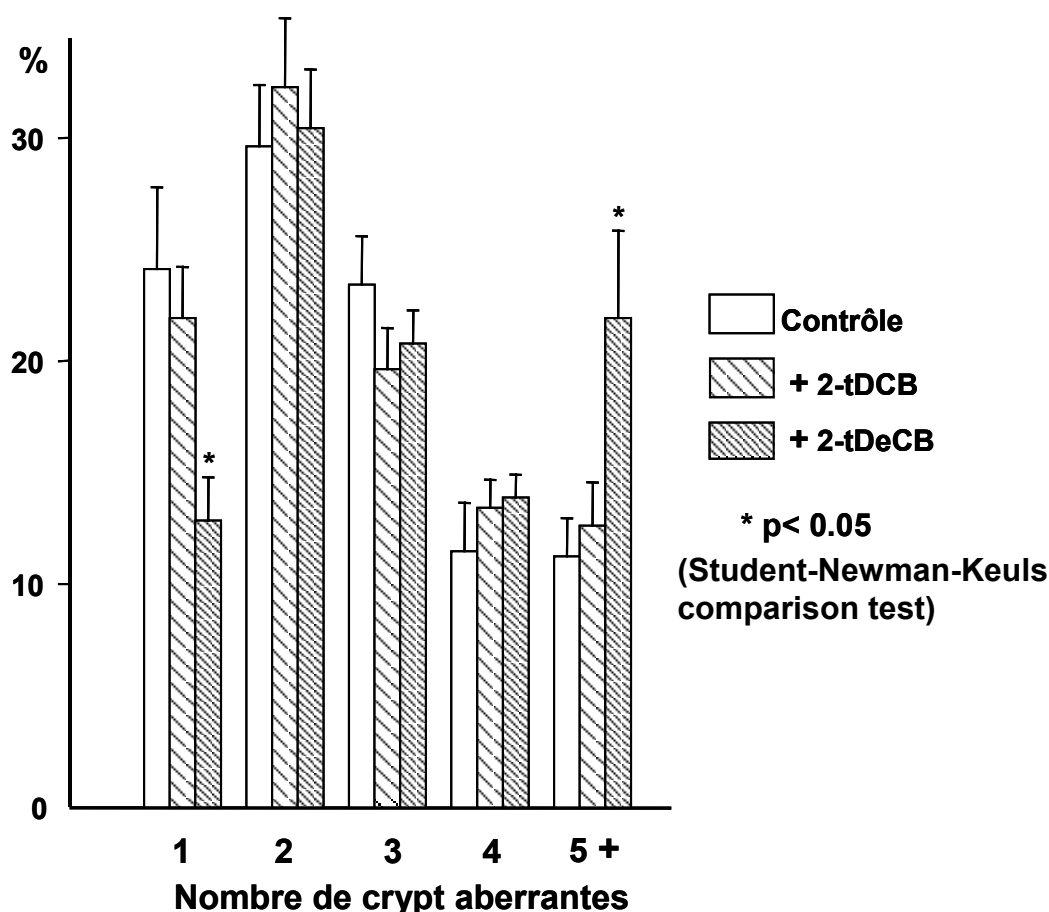


Figure 49 : Taille (nombre de cryptes pré-néoplasiques par foyer) des foyers précancéreux, 23 semaines après injection d'AOM.

Comme indiqué dans la Figure 50, le nombre de tumeurs présentes dans le côlon des rats recevant la 2-tDCB ou la 2-tDeCB est plus important par rapport aux témoins, 23 semaines après traitement à l'AOM.

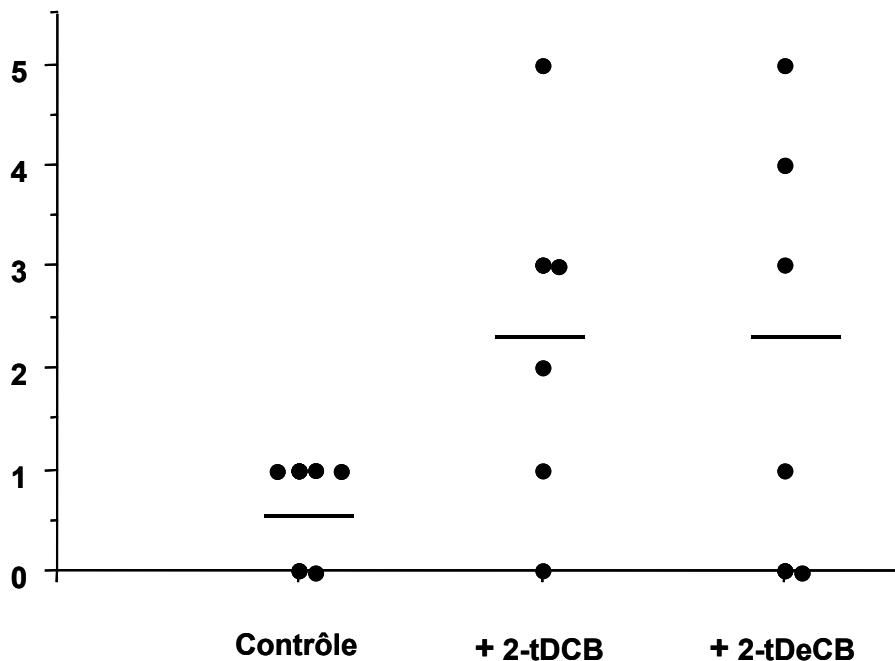


Figure 50 : Nombre total de tumeurs présentes dans les rats des différents groupes.

Le nombre moyen de tumeurs \pm ESM est de : $0,6 \pm 0,2$ pour les témoins, de $2,3 \pm 0,7$ pour le groupe 2-tDCB, et de $2,2 \pm 0,8$ pour les rats recevant de la 2-tDeCB.

Seuls des adénomes de très petites tailles sont observés dans la muqueuse colique de 4 rats contrôles (n=6). Comme présenté dans le Tableau 8, la taille de ces adénomes ne dépasse pas 6 mm^3 , et il n'y a pas plus d'un adénome présent par rat. Dans le groupe recevant de la 2-tDCB, 5 rats présentent des tumeurs localisées dans la muqueuse colique, 4 rats présentent plusieurs tumeurs et parmi ces rats, 3 rats présentent des tumeurs macroscopiques de taille supérieure à 25 mm^3 . Dans le groupe 2-tDeCB, 4 rats présentent des tumeurs coliques. Le Tableau 8, montre que dans ce groupe le côlon de 3 rats présente plusieurs tumeurs de taille moyenne (7 à 25 mm^3) et de taille supérieure à 25 mm^3 .

Tableau 8 : Dimension et nombre des tumeurs présentes dans chaque rat, 23 semaines après injection d'AOM.

RAT N°	Petits (moins de 6 mm ³)	Moyens (entre 7 et 25 mm ³)	Grands (plus que 25 mm ³)
<i>Contrôles (4/6)</i>			
1	1	0	0
2	1	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	1	0	0
6	1	0	0
<i>2-tDCB (5/6)</i>			
7	1	0	0
8	0	0	0
9	2	1	2
10	0	2	1
11	1	1	1
12	2	0	0
<i>2-tDeCB (4/6)</i>			
13	4	0	1
14	2	1	0
15	1	0	0
16	0	0	0
17	0	2	2
18	0	0	0

CONCLUSION

Les résultats présentés dans ce rapport démontrent que les rats traités par un cancérigène chimique et recevant soit de la 2-tDCB ou de la 2-tDeCB dans leur eau de boisson développent après plusieurs mois un nombre plus élevé de tumeurs comparé aux animaux contrôles également traités par le même cancérigène chimique. De plus, le côlon des rats recevant les 2-alkylcyclobutanones présente des lésions précancéreuses de plus grande taille et des formations tumorales multiples.

La conclusion principale de cette étude est que la 2-tDCB et la 2-tDeCB favorisent le développement tumoral dans le côlon de rats traités par un cancérigène chimique, démontrant que ces composés peuvent être considérés comme des promoteurs dans le processus de la cancérogenèse intestinale.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Madame F. Gossé pour son excellente assistance technique.

RÉFÉRENCES

Bird, R.P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen. Preliminary findings, *Cancer Lett.* **37**, 147-151.

Druckrey, H. (1970) Production of colon carcinoma by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. In *Carcinoma of the Colon and Antecedent Epithelium*, WJ Burdette (ed.), Thomas Publishing, Springfield, IL, pp. 267-279.

Metz, N., Lobstein A., Schneider, Y., Gossé, F., Schleiffer, R. Anton, R., Raul, F. (2000) Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract, *Nutr. Cancer*, **38**, 60-64.

Pereira, M. A., Barnes, L. H., Rassman, V. L., Kelloff, G. V., Steele, V. E. (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents, *Carcinogenesis* **15**, 1049-1054.

2.7. DETECTION DES 2-ALKYLCYCLOBUTANONES DANS LES MATIERES GRASSES ET FECALES DES ANIMAUX NOURRIS AVEC CES COMPOSES

Eric Marchioni⁽¹⁾, Péter Horvatovich⁽¹⁾ et Dalal Werner⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

⁽²⁾ CRT Aériel

INTRODUCTION

Aucune information n'est disponible aujourd'hui concernant la présence de 2-alkylcyclobutanones dans les tissus des animaux ayant consommé ces composés chimiques. C'est la raison pour laquelle le but de cette présente étude est de déterminer si la présence de deux 2-alkylcyclobutanones, les 2-(tétradec-5'-enyl)-cyclobutanone et 2-tétradécylcyclobutanone (produites respectivement à partir des acides gras oléique et stéarique), qui sont fréquemment retrouvés dans les aliments ionisés, peuvent être détectés dans les tissus adipeux de rats ayant reçu ces produits mélangés dans leur eau de boisson.

MATERIEL ET METHODES

Les produits chimiques

Les 2-alkylcyclobutanones [2-undécylcyclobutanone (2-uDCB), 2-(tétradec-5'-ényl)-cyclobutanone (2-tDeCB) et 2-tétradécylcyclobutanone (2-tDCB)] ont été synthétisées selon la méthode présentée au début du présent rapport. Le dioxyde de carbone (pureté : 99.9999%) livré avec un espace de tête de 142 bar d'hélium a été fourni par Air Product and Chemicals (Allentown, Pennsylvanie, USA). Le *tert*-butyl méthyl éther (TBME) a été fourni par Merck. Le *n*-hexane, de qualité technique, a été distillé sur de l'hydrure de calcium (Lancaster Synthesis, Morecambe, Royaume Uni). Sa pureté a été vérifiée par chromatographie en phase gazeuse. La silice 63-200 μm (i.e. 70-230 mesh) (Merck) a été chauffée à 100°C toute une nuit, laissée refroidir dans un dessiccateur et désactivée par addition d'eau ultra-pure dans la proportion de 4 ml d'eau (Milli Q+, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) pour 100 g de silice. Le Florisil, mesh 60-100/PR (Aldrich, Saint-Quentin, France), a été chauffé à 550°C (5 h), laissé refroidir dans un dessiccateur et désactivé par addition d'eau ultra-pure dans la proportion de 20 ml d'eau pour 100 g de Florisil. Ces deux adsorbants ont été conservés dans des erlens à cols rodés fermés placés à température ambiante dans un dessiccateur pendant une semaine maximum. Le sulfate de sodium a été fourni par SDS (Peypin, France), Il a été chauffé à 650°C (5 h) et laissé refroidir dans un dessiccateur avant utilisation. L'hydromatrice (Varian, Palo Alto, Californie, USA) a été lavée (6 h avec du *n*-hexane sous reflux) avant utilisation.

Animaux de laboratoire et régime alimentaire

Les expérimentations ont été conduites selon le National Research Council Guide for use and care of laboratory animals (autorisation n°00573 Ministère de l'Agriculture). Des rats mâles Wistar (n=18) pesant en moyenne 260-270 g, ont été élevés dans des conditions standardisées (22°C; 60% humidité relative; 12 h lumière/12 h nuit, ventilation à 20 volumes d'air /h), et nourris avec un régime standard et un libre accès à l'eau de boisson. Les rats ont été divisés au hasard en trois groupes (6 rats par groupe) qui ont reçu *ad libitum* le même régime alimentaire isoénergétique (UAR A04, Villemoisson/Orge, France). Ce régime alimentaire non-ionisé contenait 16% de protéines telles que de la caséine et des protéines de poisson, 60% de carbohydrates tels que de l'amidon de blé, 3% de lipides tels que du soja et de l'huile de poisson, 6% d'un mélange de sels et 1% d'un mélange de vitamines. La composition en acides gras de l'alimentation était: 2,6 mg·g⁻¹ acide palmitique, 0,5 mg·g⁻¹ acide stéarique, 8 mg·g⁻¹ acide oléique et 14,5 mg·g⁻¹ acide linoléique.

Deux groupes de rats ont reçu tous les jours à 5 heures de l'après midi une solution aqueuse fraîchement préparée contenant soit de la 2-tDCB ou de la 2-tDeCB à une concentration de 0,005% (m/v) dans de l'éthanol à 1% en tant qu'eau de boisson. Le groupe de contrôle a reçu une solution aqueuse fraîchement préparée contenant 1% d'éthanol. La consommation journalière de la boisson a été enregistrée tous les jours, la consommation moyenne de 2-tDCB ou de 2-tDeCB a été de 1 mg par rat et par jour. Le poids des animaux a été déterminé une fois par semaine durant toute la durée de l'expérimentation (4 mois).

La matière fécale de chaque rat a été prélevée pendant les trois derniers jours de la période expérimentale (entre 8h00 et 8h30 du matin) et immédiatement congelée à -80°C. Les échantillons de chaque rat ont été rassemblés afin d'obtenir une quantité minimale de 10 g par analyse. Les tissus adipeux, essentiellement des graisses épидидymales et inguinales ont été prélevés sur les animaux sacrifiés et conservés à l'état congelé (-80°C), jusqu'à leur analyse chimique réalisée en *triplicates*.

Méthode analytique

Les tissus adipeux des rats (20 g environ) et de matières fécales (10 g environ) ont été finement broyés et mélangés (50/50) avec du sulfate de sodium anhydre, placés dans une cartouche d'extraction en cellulose (d.i. 33 mm, longueur 100 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Allemagne) et soumis à extraction (6 h) avec du *n*-hexane dans un appareil Soxhlet de 125 ml de volume (4 cycles/heures) (Verlabo 2000, Strasbourg, France). Les extraits ont été concentrés à sec avec un évaporateur rotatif (220 mbar, 30°C).

La totalité de l'extrait hexanique de chaque échantillon de matière fécale a été analysée en utilisant la méthode de purification avec le Florisil, décrite dans la procédure normalisée EN 1785 (Anon., 1996). Les extraits hexaniques provenant des tissus adipeux ont été purifiés à l'aide de dioxyde de carbone supercritique. Deux grammes des extraits lipidiques ont été placés dans une cellule d'extraction de 10 ml de volume interne en acier inoxydable (d.i. 10 mm, longueur 128 mm) sur un lit d'hydromatrice (~1 g). 200 µl d'une solution hexanique de 2-undécylcyclobutanone (1 mg·ml⁻¹) (standard interne) ont été ajoutés à l'échantillon. L'espace vide restant a été rempli avec de l'hydromatrice. L'extracteur supercritique utilisé, de marque Suprex et de type Prepmaster (Pittsburg, Pennsylvanie, USA), était équipé d'un collecteur de type Accutrap constitué d'un restricteur automatique chauffé et relié à un piège solide cylindrique de 5 ml de volume interne en acier inoxydable (maintenu à température ambiante) (d.i. 10 mm, longueur 65 mm) contenant 3 g de silice désactivée [préalablement rincée avec 15 ml de *n*-hexane et séchée immédiatement avec un flux d'azote (99,995% pureté, Air Liquide, Paris, France) pendant 2 sec à une pression de 4 bar]. Le piège solide était relié à un tube à essais (piège liquide) contenant 5 ml de *n*-hexane. La cellule d'extraction était placée verticalement dans le four de l'extracteur et le flux de dioxyde de carbone la traversait (de bas en haut) à un débit de 4 ml·min⁻¹ (152 bar, 80°C, 60 min). Le collecteur de fraction Accutrap était équipé d'une pompe haute pression capable d'éluer (à température ambiante) les composés retenus sur la trappe solide avec 15 ml de *n*-hexane à un débit de 2 ml·min⁻¹ puis, après retrait du piège liquide, avec 35 ml d'un mélange de *n*-hexane et de TBME (99/1: v/v), dont seuls les 20 derniers ml ont été conservés et concentrés à 40°C sous un flux d'azote jusqu'à un volume d'environ 200 µl.

Chromatographie en phase gazeuse

Les extraits ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Varian (type 3400) couplé avec un détecteur de masse (Saturn 2000, Varian) opérant en mode d'ionisation par impact électronique (courant d'émission: 10 µA; modulation axiale: 4,0 V; auto gain control: 20000 ions; températures des piège, manifold et ligne de transfert: 150°C, 40°C et 270°C respectivement; multiplicateur d'électrons: 1800 V). Les spectres de masse ont été enregistrés entre 50 et 300 m·z⁻¹. Le chromatographe en phase gazeuse était équipé avec une colonne capillaire OV-20-MS (Ohio Valley, Marietta, Ohio, USA), 60 m, 0.25 mm d.i. avec une

épaisseur de film de 0.10 μm (20% diphényl- 80% diméthylpolysiloxane). L'injecteur de type SPI était programmé en température: température initiale (50°C, maintenue pendant 0.1 min) suivie par une augmentation de 230°C·min⁻¹ jusqu'à 240°C, température finale maintenue jusqu'à la fin du programme de température de la colonne. Ce programme était le suivant: 60°C (maintenu pendant 2 min) suivi d'une augmentation de 8°C·min⁻¹ jusqu'à 300°C, température finale maintenue pendant 15 min. Le volume d'injection était de 1 μl . Le gaz vecteur (débit : 1 ml·min⁻¹) était de l'hélium (pureté : 99,9995%, Air Liquide).

RESULTATS ET DISCUSSION

A l'issue des quatre mois de traitement, le poids de chaque animal était identique pour tous les animaux des trois groupes étudiés. Il était de l'ordre de (valeur moyenne \pm écart type): 569 \pm 14 g pour les animaux du groupe de contrôle, 577 \pm 19 g pour les animaux du groupe ayant reçu de la 2-tDCB, et 588 \pm 21 g pour les animaux du groupe ayant reçu de la 2-tDeCB.

2-alkylcyclobutanones dans la matière grasse des rats

Les chromatogrammes des extraits obtenus à partir d'animaux ayant reçu de la 2-tDCB (Figure 51c) ont présenté un pic chromatographique dont le temps de rétention et le spectre de masse était identique à celui de la 2-tDCB étalon. De même, les chromatogrammes des extraits obtenus à partir des animaux ayant été nourris avec de l'eau de boisson contenant de la 2-tDeCB (Figure 51b) présentaient un pic chromatographique dont le temps de rétention et le spectre de masse étaient identiques à celui de la 2-tDeCB étalon. Les échantillons prélevés sur des animaux du groupe de référence ne présentaient aucune trace de ces deux composés (Figure 51a). Ce résultat indiquait sans ambiguïté que les 2-alkylcyclobutanones détectées ne provenaient d'aucune contamination qu'elle soit d'origine alimentaire ou autre. Bien que les quantités consommées de 2-tDCB et de 2-tDeCB étaient identiques, les concentrations de 2-tDeCB retrouvées dans les tissus adipeux étaient approximativement 4 fois plus faibles que celles de 2-tDCB (Tableau 9). Ce composé mono-insaturé semble donc être soit moins stocké dans les cellules des tissus adipeux, soit plus métabolisé par l'organisme du rat.

Ces résultats indiquent que les 2-alkylcyclobutanones sont capables de traverser la barrière intestinale, d'entrer dans le système sanguin et d'être stockées dans les tissus adipeux de l'animal. Si l'on considère que l'animal présente une masse grasseuse moyenne de 30 g, la quantité totale de 2-tDeCB et de 2-tDCB accumulée peut atteindre 2 μg et 9 μg respectivement pour les rats ayant consommé 1 mg par jour de 2-tDCB ou de 2-tDeCB pendant la durée totale de l'expérimentation (4 mois). Ces quantités de 2-alkylcyclobutanones retrouvées dans les tissus adipeux de l'organisme restent cependant extrêmement faibles ($\approx 10^{-5}$ fois la quantité totale consommée par l'animal) (Tableau 9). Il est donc clair que ces composés sont en majorité transformés par l'animal et également, comme cela sera démontré plus loin, rejetés dans la matière fécale.

Tableau 9. Concentrations^a de 2-tDeCB et de 2-tDCB dans les tissus adipeux des rats.

Groupes	2-tDeCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de lipides)	2-tDCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de lipides)
(a) Contrôle	n.d.	n.d.
(b) 2-tDeCB	0,07 (0,03)	n.d.
(c) 2-tDCB	n.d.	0,31 (0,08)

n.d. : non détecté

^aMoyenne de trois mesures (déviations standard entre parenthèses)

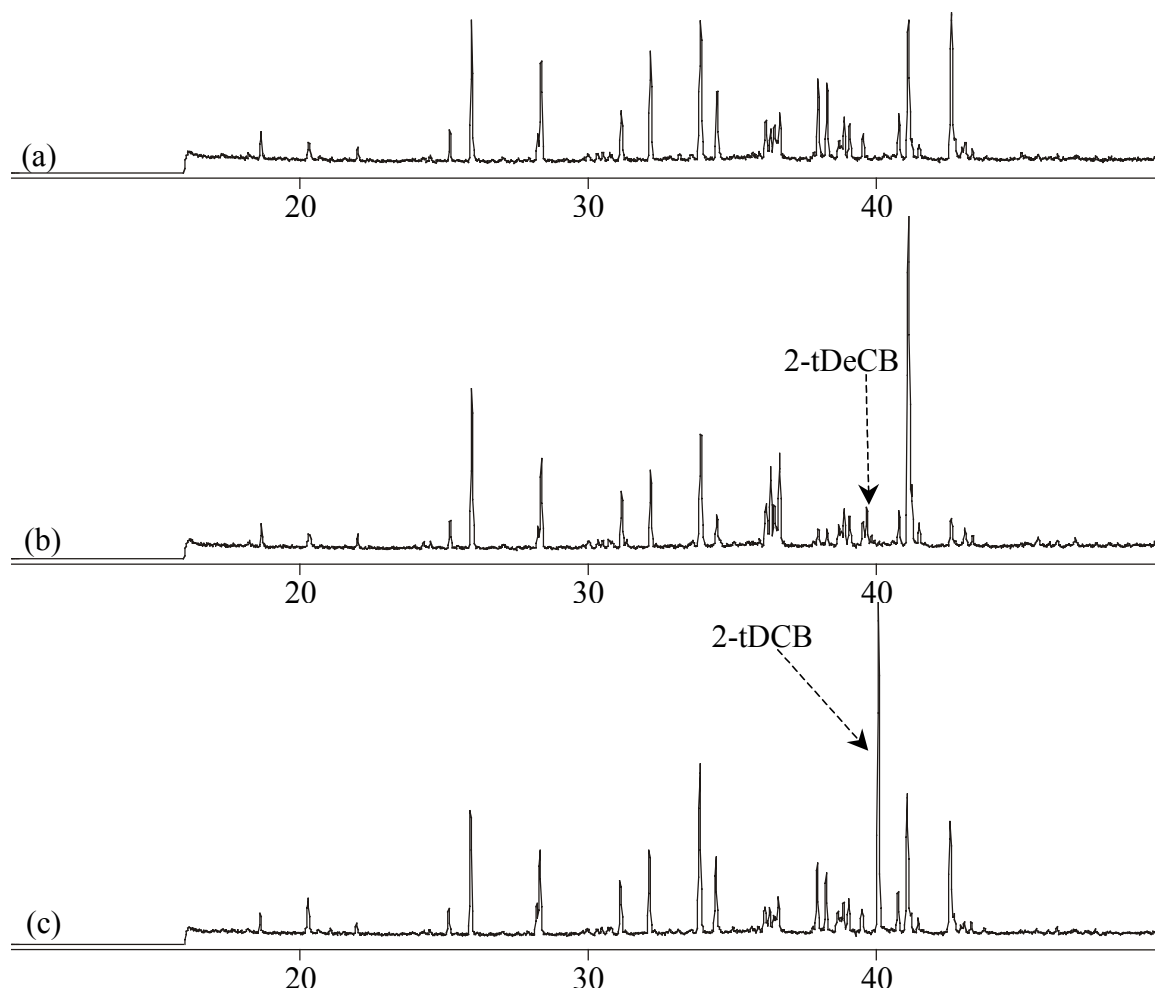


Figure 51 : Chromatogrammes ($m/z= 95+98$) des extraits obtenus à partir de tissus adipeux prélevés sur des rats ayant reçu de l'eau de boisson contenant une solution aqueuse à 1% d'éthanol (a), contenant de la 2-tDeCB (b) ou de la 2-tDCB (c).

De part la très faible quantité de matières grasses présentes dans la matière fécale des rats, celle-ci a dû être analysée à l'aide de la méthode EN 1785, procédure ne nécessitant que 200 mg de lipides.

Là encore, la matière fécale analysée ne contenait que les 2-alkylcyclobutanones qui avaient été consommées par les animaux analysés (Figure 52). Aucune 2-alkylcyclobutanone n'a été détectée dans les échantillons de matière fécale des animaux provenant du groupe contrôle n'ayant reçu dans leur eau de boisson qu'une solution aqueuse d'éthanol à 1%. Les temps de rétention et les spectres de masse des composés détectés dans la matière fécale prélevée sur les animaux ayant consommé des 2-tDCB et 2-tDeCB étaient identiques à ceux des étalons. Ces résultats indiquent clairement qu'une partie de ces molécules peut parcourir l'ensemble du tractus intestinal sans être chimiquement ou biologiquement modifiée. Les quantités de 2-tétradécyl et de 2-tétradécénylcyclobutanones retrouvées quotidiennement dans la matière fécale (3 g) étaient de l'ordre de 3,0 µg et 1,5 µg respectivement. Ces résultats indiquent que la quantité des 2-alkylcyclobutanones retrouvées chaque jour dans la matière grasse était du même ordre de grandeur que celle qui a pu être extraite des tissus adipeux des rats ayant consommé ces composés pendant 4 mois. Ces valeurs correspondent cependant seulement à 0,3 et 0,1% respectivement de la quantité consommée quotidiennement par les animaux. Cela indique clairement que la grande majorité de ces composés chimiques est soit stockée dans d'autres parties de l'organisme que les tissus adipeux, soit qu'elle est rapidement dégradée en une autre structure chimique lors du métabolisme. Elliot *et al.* (1995) avaient déjà proposé un processus de dégradation oxydative de la 2-dodécylcyclobutanone après avoir été injectée dans l'organisme d'un lapin, conduisant à l'apparition d'une γ -palmitic-lactone. Hamilton *et al.* (1996b) avaient observé cette même oxydation (et identifié la γ -palmitic-lactone) lorsque des solutions hexaniques de composés étalons étaient conservés longtemps au réfrigérateur. Il n'est donc pas exclu que cette oxydation des 2-alkylcyclobutanones se produise également dans les tissus animaux.

La quantité de 2-tDeCB retrouvée dans la matière fécale est deux fois plus faible que celle qui a été obtenue pour la 2-tDCB (Tableau 10). Il semble donc bien que cette 2-alkylcyclobutanone mono-insaturée soit plus facilement dégradée que son analogue à chaîne alkyle saturée.

Tableau 10 : Concentrations^a de 2-tDeCB et de 2-tDCB dans la matière fécale des rats.

Groupes	2-tDeCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fécès)	2-tDCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de fécès)
(a) Contrôle	n.d.	n.d.
(b) 2-tDeCB	0,5 (0,2)	n.d.
(c) 2-tDCB	n.d.	1,0 (0,2)

n.d. : non détecté

^aMoyenne de trois mesures (déviations standard entre parenthèses)

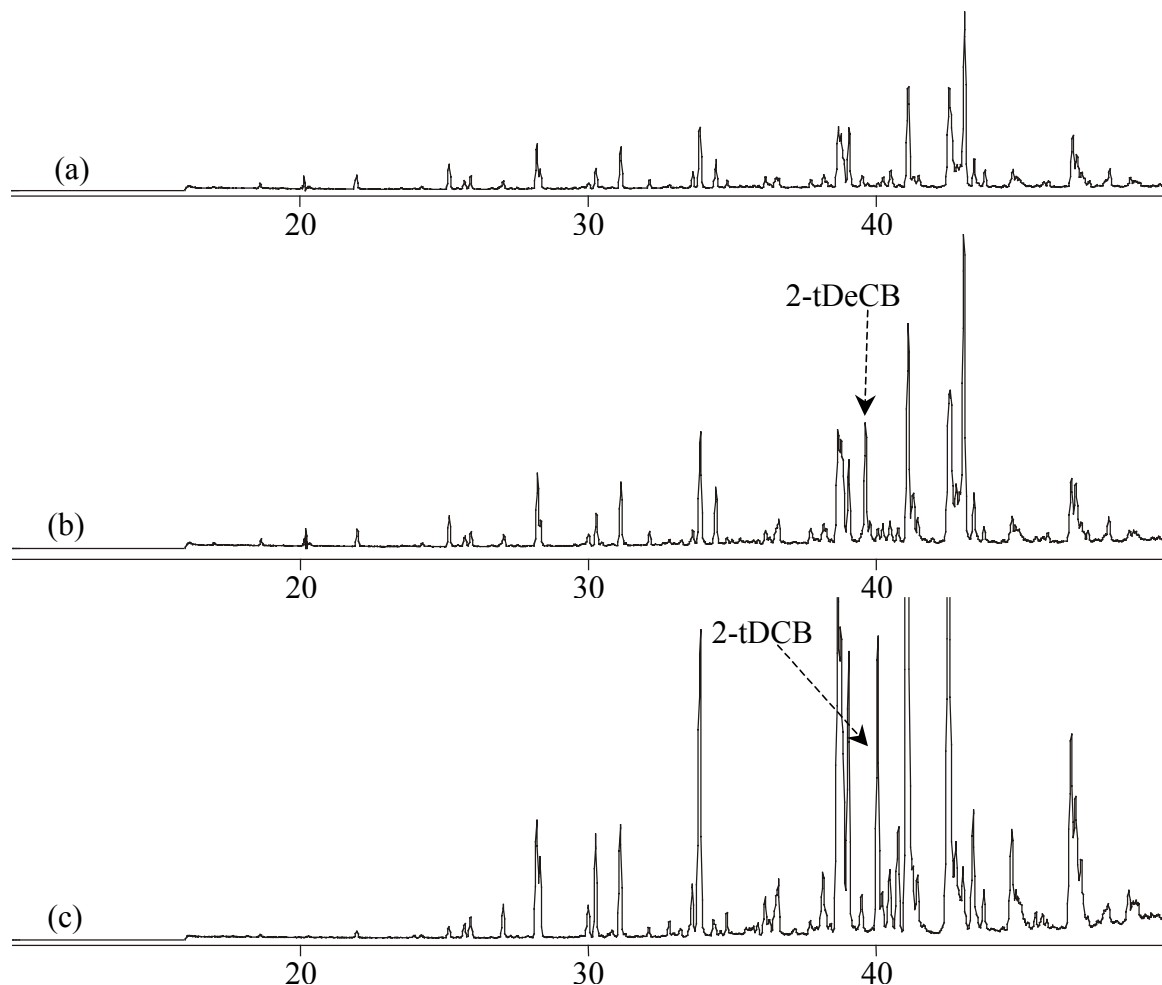


Figure 52 : Chromatogrammes ($m/z= 95+98$) des extraits obtenus à partir de matières fécales prélevées sur des rats ayant reçu de l'eau de boisson contenant une solution aqueuse à 1% d'éthanol (a), contenant de la 2-tDeCB (b) ou de la 2-tDCB (c).

Depuis la découverte faite par Le Tellier and Nawar (1972) de la présence de 2-alkylcyclobutanones dans des triglycérides ionisés et par Stevenson *et al.* (1990), dans les aliments ionisés, il s'agit du premier rapport indiquant la présence de ces composés chimiques dans les tissus d'animaux non ionisés, mais ayant été nourris avec ces substances. Ceux-ci ont été également retrouvés dans la matière fécale excrétée par les animaux. La quantité de 2-alkylcyclobutanones retrouvée tant dans les tissus adipeux que dans la matière fécale est très faible, comparativement à la quantité ingérée par les rats. Néanmoins ces résultats indiquent clairement que ces composés ne sont pas totalement stockés ou excrétés par l'organisme, mais sont soit concentrés dans d'autres parties de l'animal soit rapidement transformés par voie métabolique. D'autres recherches doivent être menées dans le futur pour déterminer les activités biologiques des 2-alkylcyclobutanones stockées dans l'organisme et de leur produits de dégradation métabolique.

REMERCIEMENTS

Nous aimerions remercier les membres des groupes participants à cette étude, ainsi que Madame S. Jung pour son excellente assistance technique.

RÉFÉRENCES

Anonym (1996), Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones, European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

Elliot C.T., Hamilton L., Stevenson M.H., McCaughey W.J., Boyd D. (1995), Detection of irradiated chicken meat by analysis of lipid extracts for 2-substituted cyclobutanones using an enzyme linked immunosorbent assay, *Analyst*, **120**, 2337-2341.

Hamilton L., Elliott C.T., Boyd D. R., McCaughey W.J., Stevenson M.H. (1996), The use of 2-substituted cyclobutanones in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of irradiated foods, In *Detection Methods for Irradiated Foods. Current Status*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 285-292.

Le Tellier P.R. and Nawar W.W. (1972), 2-Alkylcyclobutanones from radiolysis of triglycerides, *Lipids*, **7**, 75-76.

Stevenson M.H., Crone A.V.J. and Hamilton J.T.G. (1990), Irradiation detection, *Nature*, **344**, 202-203.

2.8. CONCLUSION

Dans le cadre du projet " **Etude toxicologique transfrontalière destinée à évaluer le risque encouru lors de la consommation d'aliments gras ionisés**" un nombre significatif de résultats a été obtenu. Premièrement, la synthèse des 2-alkylcyclobutanones (2-ACB) a été effectuée avec succès. Ainsi les composés saturés 2-décyl-cyclobutanone (2-DCB), 2-undécyl-cyclobutanone (2-uDCB), 2-dodécyl-cyclobutanone (2-dDCB), 2-tétradécyl-cyclobutanone (2-tDCB) et mono-insaturés 2-(undec-5'-ényl)-cyclobutanone (2-uDeCB), 2-(dodec-5'-ényl)-cyclobutanone (2-dDeCB) et 2-(tétradec-5'-ényl)-cyclobutanone (2-tDeCB) ont été produits en quantités importantes. De même, la gamma-stéaro-lactone, composé pouvant provenir de la dégradation oxydative de la 2-tDCB a été synthétisée. Les composés synthétisés obtenus étaient de grande pureté et leurs caractéristiques chromatographiques et spectrales ont été bien documentées. De la même manière, les 2 formes isomériques *cis* et *trans* de la 2-(tétradec-5'-ényl)-cyclobutanone mono-insaturée (2-tDeCB, dérivée de l'acide oléique) ont pu être purifiées avec succès, permettant d'étudier leurs propriétés toxicologiques respectives.

L'analyse des concentrations des 2-ACB produites par le traitement ionisant dans divers aliments a permis de mettre en évidence la relation linéaire qui lie la concentration de ces composés et la valeur de la dose absorbée par l'aliment, et cela même dans le cas des aliments ionisés avec de très fortes doses de rayonnement. De même il a pu être démontré que tant la longueur de la chaîne alkyle que la concentration des 2-ACB induite par le traitement ionisant ne dépendaient que du profil des acides gras précurseurs présents dans l'aliment.

Enfin, il a été montré que dans des conditions expérimentales précises les 2-ACB ont des propriétés cyto- et génotoxiques. En utilisant des cellules tumorales de côlon humain (lignées HT 29 et HT 29 clone 19A) comme un modèle lors d'expériences réalisées *in vitro*, aucun effet ni cytotoxique ni génotoxique dû aux diverses 2-alkylcyclobutanones étudiées (2-tDCB, 2-dDCB, 2-tDeCB (mélange des isomères *cis/trans*-), *cis*-2-tDeCB, *trans*-2-tDeCB et gamma-stéaro-lactone) n'a pu être mis en évidence en utilisant le test de la comète avec une durée d'incubation de 30 min à une température de 37°C. Cependant en utilisant des durées d'incubation plus importantes (1 et 2 jours) et des concentrations de 2-alkylcyclobutanones plus élevées ($\geq 50 \mu\text{M}$) des effets cytotoxiques sont apparus. Il conviendrait donc de continuer ces investigations en utilisant d'autres conditions expérimentales et en se fixant d'autres objectifs. La cytotoxicité et l'apparition de lésions oxydatives des ADN ont été étudiées en utilisant d'autres approches *in vitro* avec deux lignées de cellules humaines : les cellules de HeLa fréquemment utilisées lors de l'étude des phénomènes de réparation des ADN et les cellules tumorales de côlon humain HT29. Les altérations des bases et les fréquences de rupture des brins d'ADN ont été étudiées car elles sont de bons indicateurs des lésions oxydatives des ADN. Les résultats obtenus jusqu'ici démontrent que tous les composés étudiés (2-tDCB, 2-tDeCB, 2-d-DCB, 2-DCB) sont cytotoxiques et cela avec les deux lignées cellulaires étudiées et avec des concentrations d'expositions de 100 μM . De plus des lésions oxydatives des ADN ont été induites par toutes les 2-alkylcyclobutanones étudiées. Dans le cas des 2-tDCB et 2-tDeCB dérivées respectivement des acides stéarique (saturé) et oléique (insaturé), les lésions des ADN n'ont été détectées qu'aux concentrations cytotoxiques pour les-quelles la survie à long terme des cellules est de toute façon fortement diminuée. Néanmoins, lors de l'étude des 2-dDCB et 2-DCB dérivées respectivement des acides palmitique et myristique, il a été possible de détecter les lésions oxydatives dès les concentrations d'exposition non-cytotoxiques ce qui dénote un caractère toxique bien plus important. Le même résultat a été observé avec la γ -stéarolactone, un produit pouvant provenir de l'oxydation de la 2-tDCB qui, particulièrement avec les cellules HT 29 mais également avec les cellules HeLa, induit à un degré élevé, des lésions oxydatives des ADN.

Lorsque la bactérie *Salmonella typhimurium* est exposée aux différentes 2-ACB étudiées (2-tDCB, 2-dDCB, 2-DCB), un effet cytotoxique indéniable a pu être mis en évidence. L'intensité de cet effet est fortement liée à la longueur de la chaîne alkyle latérale: plus la chaîne est courte, plus la toxicité est aiguë. Dans les expériences réalisées au cours de ce projet, la dose toxique pour la 2-DCB est de l'ordre de 4 μM . Jusqu'à aujourd'hui, aucune activité mutagénique

n'a pu être détectée dans nos conditions expérimentales, en utilisant le test d'Ames utilisé avec *Salmonella typhimurium* (souches TA 97, TA 98 et TA 100).

De plus, il a été démontré que les 2-tDCB et 2-tDeCB ont un effet promoteur pour le développement des cancers du côlon chez les rats de laboratoire également exposés à un autre agent cancérigène. Il convient de préciser que les expériences réalisées ne permettent en aucun cas de démontrer que les 2-alkylcyclobutanones soient cancérigènes ou encore qu'elles ne peuvent seules induire des tumeurs cancéreuses. Cependant, les expériences *in vitro* et l'étude *in vivo*, effectuées avec des rats de laboratoire, ont prouvé qu'une toxicité potentielle des 2-alkylcyclobutanones existe bel et bien. Enfin, d'autres expériences au cours desquelles des rats de laboratoire ont été nourris avec des 2-alkylcyclobutanones ont permis de montrer qu'une très petite partie des 2-alkylcyclobutanones ingérée est stockée dans les tissus adipeux des animaux les ayant consommées, et que seule une petite partie était rejetée dans la matière fécale. Ces résultats indiquent que la majeure partie des 2-alkylcyclobutanones ingérée est métaboliquement transformée (ou stockée dans d'autres parties du corps). Il semble donc très important de réaliser d'autres études afin de déterminer le devenir métabolique des 2-alkylcyclobutanones ingérées.

Nous tenons à nous protéger contre toute utilisation abusive des données scientifiques présentées dans ce rapport, destinée à discréditer le traitement ionisant des aliments. Aujourd'hui il est simplement trop tôt pour pouvoir fournir une quelconque conclusion concernant le risque encouru par l'homme lors de la consommation d'aliments gras ionisés. En effet, force est de reconnaître que l'ensemble des études réalisées dans le cadre de ce projet a été fait avec des substances étalons de grande pureté (et non avec des aliments ionisés contenant un grand nombre de composés différents), et cela avec des cellules en culture et des animaux de laboratoire et non avec des humains.

De toute façon, étant donné les résultats présentés dans ce rapport qui font état, pour certaines des 2-alkylcyclobutanones étudiées, de propriétés toxiques, géno et cyto-toxiques et même de promotion de tumeurs cancéreuses, nous recommandons fortement que d'autres études complémentaires soient menées afin de pouvoir déterminer le risque pour la santé humaine. Malheureusement, ce risque ne peut aujourd'hui être évalué car il manque encore un certain nombre de résultats scientifiques et cela dans divers domaines de recherche. Afin de pouvoir sérieusement caractériser ce risque potentiel, il conviendrait que le danger soit clairement identifié, que l'exposition, la relation dose-effet et particulièrement le métabolisme des 2-alkylcyclobutanones et sa cinétique dans les organismes vivants, soient clairement élucidés. Toutes ces études doivent être entreprises car elles sont nécessaires pour bien maîtriser les effets toxiques et leurs mécanismes d'action. De nombreuses questions restent aujourd'hui sans réponse et beaucoup de travaux restent à réaliser. Nous avons fait le premier pas, commencé les études et nous espérons pouvoir être capables de fournir de plus amples informations dans un futur proche.

Inhaltsverzeichnis

Teilnehmerliste.....	107
Abkürzungsverzeichnis.....	108
WISSENSCHAFTLICHER SCHLUSSBERICHT	
1. Ausgangspunkt und Projektbeschreibung.....	109
2. Ergebnisse und Diskussion.....	112
2.1 Synthese und Charakterisierung der zu untersuchenden Prüfsubstanzen	112
2.2 Trennung der <i>cis</i> - und <i>trans</i> - Isomere des 2-Tetradecenylcyclobutanons	123
2.3 Radioaktiv markierte Substanzen.....	127
2.4 Auslieferung der Prüfsubstanzen.....	127
2.5 Bestimmung des Gehaltes an 2-Alkylcyclobutanonen in bestrahlten Lebensmitteln	138
2.6 Toxikologische Untersuchungen.....	153
2.6.1 Cytotoxizität und Genotoxizität von 2-Alkylcyclobutanonen in Human-Colontumor-Zell-Linien (HT 29 und HT 29 cl 19A)	153
2.6.2 Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-Alkylcyclobutanone in HeLa-Zellen, sowie in Colontumor-Zellen (HT 29).....	169
2.6.3 Toxikologische Effekte in Bakterien durch 2-Alkylcyclobutanone	177
2.6.4 Der Einfluß von 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB) und 2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB) auf die Darm-Carcinogenese in Ratten.....	186
2.7 Nachweis der 2-Alkylcyclobutanone in Fettgewebe und Faeces von Versuchstieren, denen diese Substanzen verabreicht wurden	191
2.8 Schlussfolgerungen	197

TEILNEHMER

Université Louis Pasteur de Strasbourg-CNRS,

Eric Marchioni

Faculté de Pharmacie,

Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment - UMR 7512

74, route du Rhin F-67400 Illkirch

Tel : 00.33.(0)3.90.24.43.26 Fax : 00.33.(0)3.88.66.01.90

E-Mail : eric.marchioni@pharma.u-strasbg.fr

Université Louis Pasteur de Strasbourg-INSERM

Francis Raul

Laboratoire du Contrôle Métabolique et Nutritionnel en Oncologie Digestive (IRCAD)

1, Place de l'hôpital, F-67000 Strasbourg.

Tel : 00.33.(0)3.88.11.90.23

E-Mail : Francis.Raul@ircad.u-strasbg.fr

Université Louis Pasteur de Strasbourg-CNRS

Michel Miesch

Faculté de Chimie, Laboratoire de Chimie Organique Synthétique - UMR 7123

1, rue Blaise Pascal BP 296/R8 F-67008 Strasbourg Cedex

Tel/ Fax : 00.33.(0)3.90. 24 17 52

E-Mail : miesch@chimie.u-strasbg.fr

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)

Dominique Burnouf

Groupe d'Epidémiologie Moléculaire du Cancer (IRCAD) - UPR 9003

1, Place de l'hôpital, F-67000 Strasbourg

Tel : 00.33.(0)3.88.11.90.31 FAX : 00.33.(0)3.88.11.90.99

E-Mail : Dominique.Burnouf@ircad.u-strasbg.fr

Universität Karlsruhe

Andrea Hartwig

Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie

Kaiserstrasse, 12, Postfach 6980 D-76128 Karlsruhe

Tel : 0049(0)721- 608-2936 FAX : 0049(0)721 - 608-7254

E-Mail : Andrea.Hartwig@chemie.uni-karlsruhe.de

Bundesforschungsanstalt für Ernährung

Henry Delincée

Haid-und-Neu-Str. 9, D-76131 Karlsruhe

Tel : 0049(0)721-6625-405 FAX : 0049(0)721-6625-404

E-Mail : henry.delincee@bfe.uni-karlsruhe.de

Aérial

Dalal Aoudé Werner

19, rue de Saint Junien, F-67300 Schiltigheim

Tel : 00.(0)3.88.19.15.21 FAX : 00.(0)3.88.19.15.23

E-Mail : da.werner@aerial-crt.com

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-Alkylcyclobutanone und Kohlenwasserstoffe

2-ACB	2-Alkylcyclobutanon (im Allgemeinen)
2-HCB	2-Hexylcyclobutanon
2-OCB	2-Octylcyclobutanon
2-DCB	2-Decylcyclobutanon
2-uDeCB	2-(Undec-5'-enyl)cyclobutanon
2-uDCB	2-Undecylcyclobutanon
2-dDeCB	2-(Dodec-5'-enyl)cyclobutanon
2-dDCB	2-Dodecylcyclobutanon
2-tDeDCB	2-(Tetradec-5'-enyl)cyclobutanon
2-tDCB	2-Tetradecylcyclobutanon
C _{16:2}	1,7-Hexadecadien

Einheiten

% m/m	Gewichtsprozent
% m/v	% Gewicht / Volumen
% v/v	Volumenprozent

Diverse

¹³⁷ Cs	Isotop Cäsium - 137
⁶⁰ Co	Isotop Kobalt - 60
Abs	abwesend
BCR	Bureau Communautaire de Référence, Brüssel (Europäisches Referenzbüro)
CEN	Comité Européen de Normalisation, (Europäisches Komitee für Normung)
CHCH	2-Cyclohexylcyclohexanon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN X	Europäische Norm Nr. X
ESR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations (Organisation für Ernährung und Landwirtschaft der Vereinten Nationen)
GC/FID	Gaschromatographie/Flammenionisationsdetektor
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
IAEA	International Atomic Energy Agency (Internationale Atomenergiebehörde)
MTT	3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PFHA	O-(2,3,4,5,6) Pentafluorobenzylhydroxylamin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Solid phase extraction (Festphasen-Extraktion)
SPI	Kaltaufgabe-System
TBME	tert-Butylmethylester
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
URP	unique radiolytic product
VVSM	viande de volaille séparée mécaniquement (Geflügelseparatorenfleisch)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation, Genf)
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat

WISSENSCHAFTLICHER SCHLUSSBERICHT

1. AUSGANGSPUNKT UND PROJEKTBECHREIBUNG

In den letzten zehn Jahren ist eine Reihe von analytischen Methoden zum Nachweis bestrahlter Lebensmittel entwickelt worden. Auf europäischer Ebene hat die Arbeitsgruppe 8 „Bestrahlte Lebensmittel“ im Rahmen des Technischen Komitees 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ des Europäischen Komitees für Normung, CEN, bereits fünf Europäische Normen zum Nachweis von bestrahlten Lebensmittel veröffentlicht (CEN/TC 275 / WG 8). Eine dieser Methoden (EN 1785) beruht auf dem Nachweis von strahleninduzierten 2-Alkylcyclobutanonen, die nach gaschromatographischer Trennung (GC) durch Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Die 2-Alkylcyclobutanone werden durch Bestrahlung aus den in Lebensmitteln erhaltenen Triglyceriden gebildet (Abb. 1).

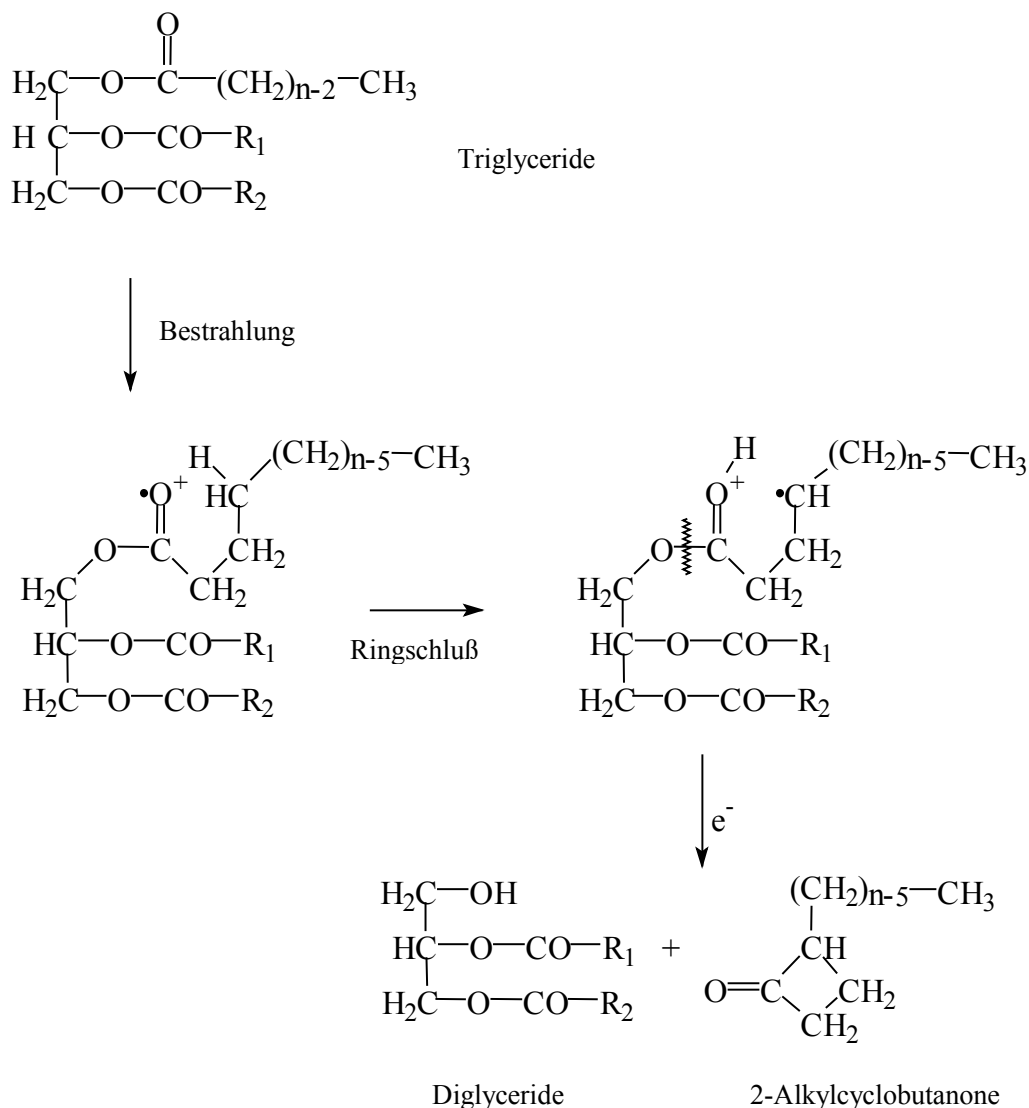


Abb. 1: Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen.

Eine Besonderheit der 2-Alkylcyclobutanone besteht darin, dass es zur Zeit keine Hinweise gibt, dass diese Substanzen auch in unbestrahlten Lebensmitteln nachgewiesen werden können, sondern sie sind bis heute nur in bestrahlten Lebensmitteln gefunden worden.

Die 2-Alkylcyclobutanone werden daher – bis das Gegenteil bewiesen ist – als „Unique Radiolytic Products“ angesehen.

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen ist eine der neueren Konservierungsmethoden. Diese Methode hat ihre Hauptanwendung in der Praxis bei der Abtötung von unerwünschten Mikroorganismen, Parasiten oder Insekten. Dabei verbessert die Bestrahlung die hygienische Qualität der Lebensmittel und verhindert Krankheiten, die sonst durch Verzehr von mit Parasiten oder pathogenen Mikroorganismen kontaminierten Nahrungsmitteln verursacht werden können. Weiterhin ermöglicht die Bestrahlung für bestimmte Lebensmittel eine Verbesserung der Haltbarkeit.

Sie wird inzwischen in verschiedenen Ländern an einer großen Palette von Lebensmitteln angewandt, die entweder direkt zum Verbraucher gelangen oder in der Lebensmittelindustrie weiterverarbeitet werden. Besonders bei Lebensmittelzutaten für die industrielle Weiterverarbeitung ist heute vielfach die Bestrahlung eine aussichtsreiche Alternative zu anderen Konservierungsverfahren. So können Kräuter und Gewürze erfolgreich durch Bestrahlung entkeimt werden, statt sie einer Begasung mit z.B. Ethylenoxid zu unterwerfen, da diese Begasungsmittel potentiell schädliche Rückstände hinterlassen. Durch den Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln bzw. Lebensmittelzutaten wird der Verbraucher daher der Wirkung der 2-Alkylcyclobutanone ausgesetzt.

In dem WHO-Bericht N°659 (Anon. 1981) schlussfolgerte ein gemeinsames Expertenkomitee der FAO/IAEA/WHO, dass die Bestrahlung von Lebensmitteln bis zu einer mittleren Gesamtdosis von 10 kGy gesundheitlich unbedenklich ist. Erst viel später wurden die 2-Alkylcyclobutanone in bestrahlten Lebensmitteln für den analytischen Nachweis einer erfolgten Bestrahlung genutzt (Stevenson, *et al.*, 1990; Stevenson, 1996). Deshalb stellt sich die Frage, inwieweit eine mögliche Toxizität der 2-Alkylcyclobutanone für den Verbraucher beim Verzehr bestrahlter Lebensmittel Relevanz aufweist. Diese Fragestellung soll im vorliegenden Projekt bearbeitet werden.

Ziel der Arbeit ist es, das toxikologische Potential einer Substanzgruppe (der 2-Alkylcyclobutanone), die durch ionisierende Strahlen aus dem Fett (Triglyceriden) der Lebensmittel gebildet wird, zu charakterisieren und eine Risikoabschätzung für den Verbraucher durch den Verzehr bestrahlter Lebensmittel vorzunehmen. Diese Arbeit ist deshalb für die Gremien, die für die Zulassung bestrahlter Lebensmittel zuständig sind, wie in Frankreich der "l'Agence Française de Sécurité Alimentaire" (vorher bekannt als "Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France"), der "Wissenschaftliche Lebensmittelausschuß" der EU und in Deutschland die Bundesministerien für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten sowie für Gesundheit von Bedeutung. Außerdem stellt die Arbeit eine wertvolle Ergänzung des Wissens über die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen dar.

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, sowohl die Exposition der Verbraucher - individuell als auch als Gesamtpopulation - durch diese neue Substanzgruppe in unseren Lebensmitteln festzustellen, als auch das Risiko (mögliche toxische Eigenschaften der 2-Alkylcyclobutanone, die zwar in geringen Mengen, aber über größere Zeiträume beim Verzehr bestrahlter Lebensmittel aufgenommen werden) abzuschätzen. Eine Voraussetzung dafür ist die genaue Bestimmung der Substanzen in den bestrahlten Lebensmitteln. Dieses Projekt läßt sich in 3 Abschnitte teilen:

- 1.) Chemische Synthese der 2-Alkylcyclobutanone (eventuell radioaktiv markiert), die Bestimmung ihrer Reinheit und chromatographischen und massenspektrometrischen Eigenschaften,

- 2.) Analyse der gebildeten Mengen in bestrahlten Lebensmitteln mittels der Europäischen Norm EN 1785 (Anon. 1996) , und
- 3.) Untersuchung des toxikologischen Potentials der 2-Alkylcyclobutanone mit Hilfe verschiedener Methoden, z.B. *in vitro*-Tests zur Wechselwirkung mit der DNA, wie Comet Assay, "Alkaline Unwinding" und Plasmid-Elektrophorese, weiterhin Mutagenitätstests und schließlich *in vivo*-Studien zur Darm-Kanzerogenese, sowohl mit Ratten als auch evt. mit transgenen Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen einen besseren Überblick über die neuartigen Substanzen in unseren Lebensmitteln ermöglichen, verbunden mit einer Aussage über deren gesundheitliche Unbedenklichkeit. Durch die Ergebnisse soll die Abschätzung über die Exposition gegenüber den 2-Alkylcyclobutanonen und die damit verbundenen Risiken für den einzelnen Verbraucher bzw. die Gesamtpopulation verbessert werden.

Aus sozio-ökonomischer Sicht sind die Ergebnisse dieser Studie von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung des Einsatzes der Lebensmittelbestrahlung (bei Abwesenheit von relevanten toxischen Befunden) bzw. für eine Begrenzung dieser Konservierungsmethode (bei Feststellung einer relevanten Toxizität der 2-Alkylcyclobutanone).

Eine verbesserte Risikoabschätzung ist auch für den Verbraucher von großem Interesse, da immer noch große Teile der Bevölkerung ernsthaft über die möglichen gesundheitlichen Auswirkungen der Lebensmittelbestrahlung besorgt sind.

LITERATUR

Anonym (1981) *Wholesomeness of irradiated food*. Report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, World Health Organization, Geneva, Technical Report Series 659.

Anonym (1996) Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones, European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

Stevenson ,M.H., Crone, A.V.J. and Hamilton, J.T.G. (1990) Irradiation detection. *Nature*, **344**, 202-203.

Stevenson, M.H. (1996) Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial. In "*Detection Methods for Irradiated Food - Current Status*", C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray and J. Pearce, eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 269-284.

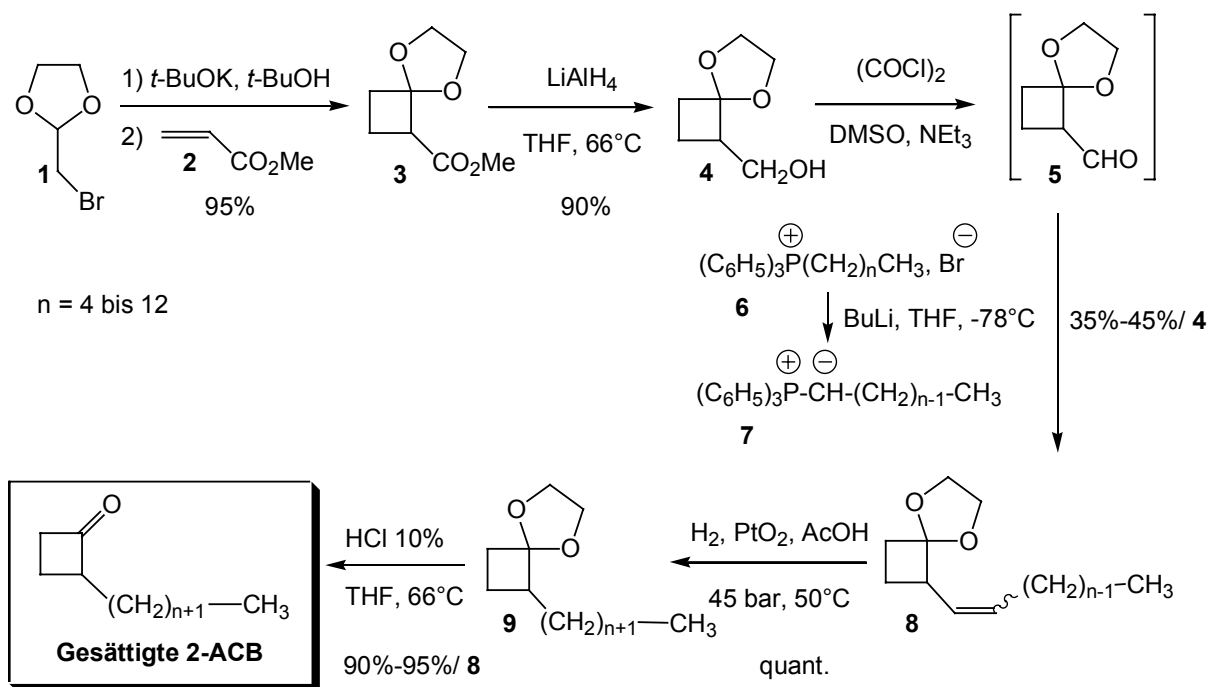
2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.1. SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG DER ZU UNTERSUCHENDEN PRÜFSUBSTANZEN

Michel Miesch

Laboratoire de Chimie Organique Synthétique (UMR 7123)
 Université Louis Pasteur de Strasbourg

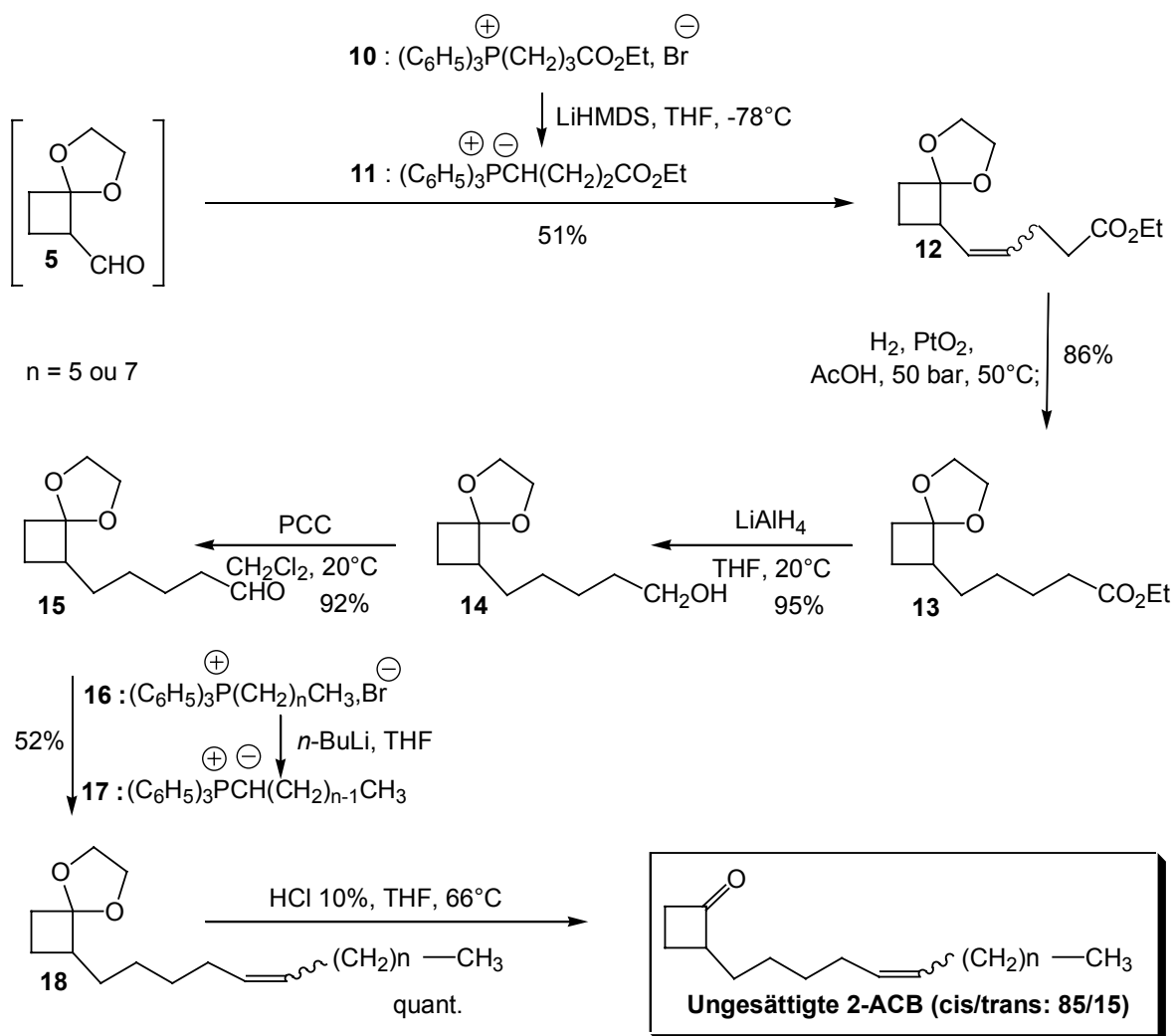
2-Alkylcyclobutanone (2-ACB), mit gesättigten oder ungesättigten Kohlenstoff-Seitenketten, werden durch ionisierende Bestrahlung von fetthaltigen Lebensmitteln aus den Fettsäuren gebildet. Die 2-ACB werden als « Unique Radiolytic Products » (URP) betrachtet, d.h. als Substanzen, die spezifisch nur bei einer ionisierenden Bestrahlung gebildet werden. Folglich ist der Nachweis (oder Nicht-Nachweis) von 2-ACB - die damit als spezifische Marker einer Bestrahlung dienen - ein eindeutiger Hinweis, dass das Lebensmittel mit ionisierenden Strahlen behandelt wurde (oder auch nicht). Die 2-ACB werden gaschromatographisch getrennt und mit einem Massenspektrometer detektiert. Dabei ist der Vergleich mit internen Standardlösungen der 2-ACB erforderlich. Um diese Standards herzustellen ist eine neue Synthese der 2-ACB wünschenswert, da die bisher beschriebenen Synthesen wenig effizient waren (Boyd *et al.*, 1991, Crone *et al.*, 1993 und Hamilton *et al.*, 1996). Auch in Anbetracht der relativ großen Menge der benötigten Prüfsubstanzen für die toxikologischen Untersuchungen war es erforderlich, eine neue und schnelle Synthese zu entwickeln. Zunächst wurde eine Synthese entwickelt (Miesch *et al.*, 1999), die als ersten Schritt eine [2+2] Cycloaddition zwischen dem Bromderivat **1** und Ethyl-Acrylat **2** vorsieht, die zu einem Cyclobutan-Ester **3** (Kirmse *et al.*, 1969) führt. Durch einen Redoxprozess bildet sich über den Alkohol **4** der instabile Aldehyd **5** (Gruseck und Heuschmann, 1990), der dann durch eine Wittig-Reaktion mit Phosphoranen **7** (durch Behandlung des entsprechenden Phosponium-Salzes **6** mit BuLi hergestellt) zum Olefinderivat **8** führt ($n = 4$ bis 12). Die Länge der Seitenkette wird einfach durch die Wahl des entsprechenden Phosphoniumsalzes bestimmt. Die Doppelbindung wird danach hydriert unter Bildung der Dioxolane **9** und nach Abspaltung der Schutzgruppe des Carbonyls werden die gesättigten 2-Alkylcyclobutanone erhalten (Abb. 2), nämlich das 2-Hexyl- ($n = 4$), 2-Heptyl- ($n = 5$), 2-Octyl- ($n = 6$), 2-Decyl- ($n = 8$), 2-Undecyl- ($n = 9$), 2-Dodecyl- ($n = 10$) und 2-Tetradecylcyclobutanon ($n = 12$) (Abb. 2).



$n = 4$: 2-Hexylcyclobutanon; $n = 5$: 2-Heptylcyclobutanon; $n = 6$: 2-Octylcyclobutanon; $n = 8$: 2-Decylcyclobutanon;
 $n = 9$: 2-Undecylcyclobutanon; $n = 10$: 2-Dodecylcyclobutanon; $n = 12$: 2-Tetradecylcyclobutanon.

Abb. 2: Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer gesättigten Seitenkette.

Für die 2-Alkylcyclobutanone, die über eine ungesättigte Seitenkette verfügen, wurde eine Synthese entwickelt, die vom Aldehyd **5** ausgeht. Eine erste Wittig-Reaktion unter Verwendung eines Phosphorans **11** (erhalten durch eine Reaktion des Phosphoniumsalzes **10** mit LiHMDS) führt zu einem γ, δ -ungesättigten Ester **12**. Eine Hydrierung unter Druck ergibt einen Ester **13**, der zum Alkohol **14** reduziert wird. Durch Oxidation (Corey *et al.*, 1975) von **14** erhält man den Aldehyd **15**, der dann durch eine zweite Wittig-Reaktion unter Verwendung des Phosphorans **17** (erhalten durch eine Reaktion des Phosphoniumsalzes **16** mit *n*-BuLi) das Olefin **18** ergibt. Wie bei der ersten Synthese der gesättigten 2-Alkylcyclobutanone ist es möglich, die Kettenlänge des Phosphoniumsalzes und damit die der Phosphorane zu verändern. Zum Schluß erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppe des Carbonyls unter Erhalt des gewünschten ungesättigten 2-Alkylcyclobutanons, als Mischung der Isomere *cis* / *trans* (Abb. 3).



$n = 5$: 2-Dodecenylcyclobutanon;

$n = 7$: 2-Tetradecenylcyclobutanon

Abb. 3: Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer ungesättigten Seitenkette.

Dieser erste Syntheseweg führt zu den gewünschten 2-Alkylcyclobutanonen, hat jedoch einige Nachteile: z.B. sind insgesamt 7 - 10 Stufen erforderlich mit 2 - 7 Auftrennungen durch Chromatographie auf Silikagel. Ein 'Scale-up' der Reaktionen ist schwierig und die Menge des Produktes ist begrenzt auf etwa 500 - 600 mg.

Es wurde deshalb ein zweiter Reaktionsweg mit Cyclobutanon **19** als Ausgangssubstanz entwickelt. Nach Bildung des Hydrazons **20**, wird eine Alkylierungsreaktion des Carbanions des Hydrazons **20** mit unterschiedlichen Alkylhalogeniden **21** durchgeführt. Schließlich führt eine Säurebehandlung zum gewünschten 2-Alkylcyclobutanon (Abb. 4) (Mino *et al.*, 1997).

RX = CH₃(CH₂)_nBr; n = 12, 14

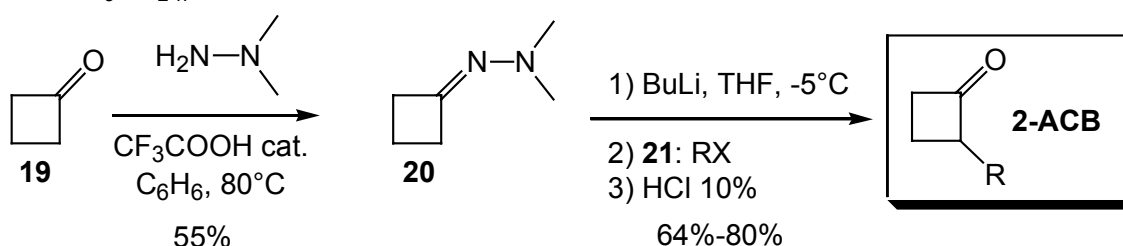


Abb. 4: Zweite Synthese der 2-Alkylcyclobutanone.

Dieser neue Reaktionsweg ist sehr bequem, da die unterschiedlichen Alkylhalogenide kommerziell verfügbar sind und auch weil der Zugang zu ungesättigten Alkenylhalogeniden einfach ist. So werden z.B. das 1-Bromo-dodec-5-en **25** (Vorläufer von 2-Dodecencylcyclobutanon) und das 1-Bromo-tetradec-5-en **26** (Vorläufer des 2-Tetradecencylcyclobutanons) wie folgt hergestellt: das Ausgangsmaterial ist das 1,5-Pentandiol **22**. Eine Monobromierungsreaktion führt zum bromierten Alkohol **23**, der nach Oxidation (Corey *et al.*, 1975) den Aldehyd **24** ergibt. Durch eine Wittig-Reaktion (wieder ist es möglich, die Kettenlänge zu justieren), entstehen die gewünschten ungesättigten Halogenide **25** und **26**. Der Weg zu den ungesättigten 2-Alkylcyclobutanonen ist danach mit der oben beschriebenen Methode möglich. Es sollte beachtet werden, dass dieser Reaktionsweg zu einer (85/15) Mischung von *cis* / *trans* ungesättigten 2-Alkylcyclobutanonen führt (Abb. 5).

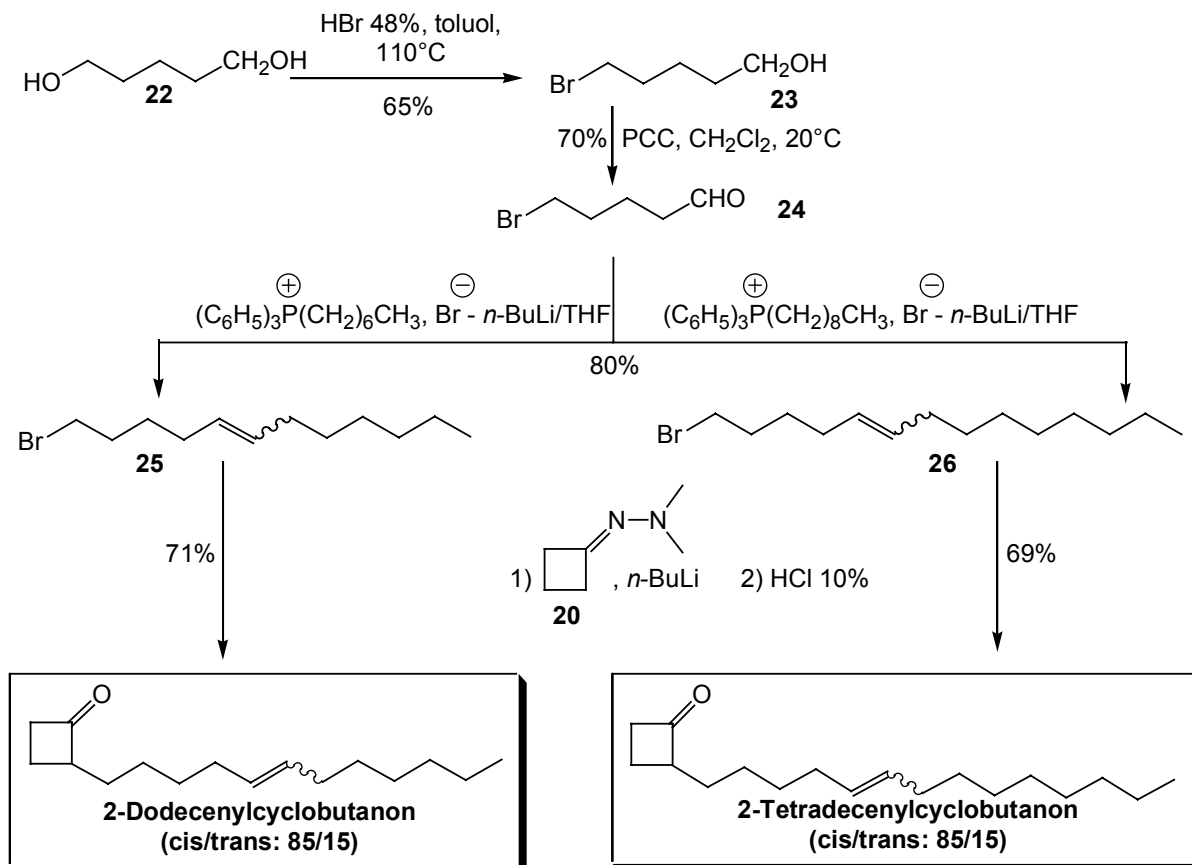


Abb. 5: Zweite Synthese der ungesättigten 2-Alkylcyclobutanone.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der zweite hier vorgestellte Syntheseweg zur Herstellung von 2-ACB mit gesättigten oder ungesättigten Seitenketten effektiver ist als die zuerst vorgestellte Synthese (Miesch et al., 1999). Beim letzteren war für die Herstellung von 0,5 g gesättigten 2-ACB ein Zeitaufwand von 1 Woche erforderlich, während für 0,5 g ungesättigter 2-ACB 2 Wochen benötigt wurden. Natürlich können mehrere Versuchsansätze gleichzeitig nebeneinander durchgeführt werden, jedoch kann bei der Reinigung der Reaktionsprodukte mittels Silicagelchromatographie höchstens 1 g Rohprodukt auf der Säule appliziert werden. Dies ist ein bedeutender Nachteil.

Der zweite Syntheseweg ist einfacher und schneller als der erste, da gerade 2 bzw. 4 Reaktionsstufen für die gesättigten bzw. ungesättigten 2-ACB erforderlich sind, während beim ersten Syntheseweg jeweils 7 bzw. 10 Reaktionsstufen benötigt werden. So werden für die Herstellung von 0,5 g gesättigten bzw. ungesättigten 2-ACB jetzt nur noch 3 Tage bzw. 1 Woche gebraucht. Wie beim ersten Syntheseweg besteht jedoch ein Engpass bei der Aufreinigung der Rohprodukte mittels Silicagelchromatographie. Dieser Nachteil bleibt.

Der zweite Syntheseweg erlaubte uns ausreichende Mengen der 2-ACB für die verschiedenen Untersuchungen von unseren Partnern im INTERREG-Projekt herzustellen.

MATERIAL UND METHODEN

Allgemeine Bemerkungen

Reaktionsbedingungen: es wurde wasserfrei, unter Argon-Atmosphäre, mit entgasten Lösungsmitteln, unter Verwendung von Magnetrührern gearbeitet.

Alle verwendete Chemikalien waren kommerzielle Produkte der Firmen Aldrich, Lancaster, oder Avocado.

Die eingesetzten Lösungsmittel wurden wie folgt destilliert:

- Dichlormethan über Phosphorpentoxid
- Diethylether und Tetrahydrofuran über Natrium/Benzophenon
- Hexan, Toluol und Benzen über Calciumhydrid

Triethylamin und Diisopropylamin wurden destilliert und über Kaliumcarbonat aufbewahrt.

n-Butyllithium (kommerziell erhältlich von Aldrich als 1,6 M in Hexan) wurde vor jeder Anwendung mit Diphenyllessigsäure dosiert.

Für die Dünnschicht-Chromatographie wurden Silicagel-Platten (MERCK Silicagel 60 F₂₅₄) eingesetzt, und die Spots mit Hilfe einer UV-Lampe (254 nm oder 360 nm) lokalisiert oder mit einer Vanillin-Lösung (25g in 1l EtOH/H₂SO₄ (98/2)) besprüht und anschließend erhitzt. Der Reaktionsverlauf und die Reinheit der Reaktionsprodukte wurden mit der Dünnschicht-Chromatographie überprüft.

Für die Säulenchromatographie wurde MERCK Silicagel 60 (40-60µm) eingesetzt.

Schmelzpunkte wurden auf einer Heizplatte aus Platin (Reichert) unter dem Mikroskop bestimmt.

Spektroskopie

- IR-Spektren in CCl_4 -Lösung wurden in einem PERKIN-ELMER IR 881 Spektralphotometer gemessen.
- UV-Spektren sowie Messungen im sichtbaren Bereich wurden in CH_3CN -Lösung mit einem PERKIN-ELMER UV-550 Spektralphotometer aufgenommen.
- ^1H -NMR Spektren wurden gemessen in deuteriertem Chloroform oder Benzen bei 200 MHz (BRUKER WP-200, AC-200), bei 400 MHz (BRUKER DRX-400) und bei 500 MHz (BRUKER ARX-500). Die Verschiebungen (δ) im Vergleich zum nicht-deuterierten Lösungsmittel wurden als internen Referenz genutzt ($\delta=7,26$ ppm für CDCl_3 oder 7,16 ppm für C_6D_6 ^1H NMR).
- Die ^1H NMR Daten werden in der Reihenfolge : chemical shift (δ), multiplicity (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet), Anzahl der Protonen und die Kupplungskonstanten (J) in Hz angegeben.
- Die ^{13}C NMR Spektren wurden in deuteriertem Chloroform oder Benzen bei 50 MHz (BRUKER AC-200), 100 MHz (BRUKER DRX-400) oder 125 MHz (BRUKER ARX-500) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden relativ zu Tetramethylsilan (TMS) gemessen.

Elementaranalyse

- Die Elementaranalyse ($\text{C,H} \pm 0,3 \%$) erfolgte beim Laboratoire de Microanalyses der Universität Louis Pasteur in Strasbourg.

Durchführung der Synthesen

* Erster Syntheseweg

Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer gesättigten Alkylkette

Die beschriebene Verfahrensweise bezieht sich auf die Synthese des 2- Tetradecylcyclobutanons. Sie ist jedoch ebenso anwendbar auf die Synthese der anderen gesättigten 2-Alkylcyclobutanone. Zu diesem Zweck muss nur die Alkylkette des Phosphorans, welches bei der Wittig-Reaktion eingesetzt wird, mit der gewünschten Länge ausgewählt werden.

Olefin 8

DMSO (880 mg; 11,26 mmol) wurde zu 1,43 g (11,26 mmol) Oxalyl-chlorid (gelöst in 10 mL Dichlormethan) bei -78°C hinzugegeben. Die Mischung wurde 10 min bei -78°C gerührt, und dann der Alkohol **4** (1,35g; 9,38 mmol) (Kirmse und Schneider, 1969) tropfenweise zugegeben. Diese Mischung wurde jetzt 30 min bei -78°C gerührt. Tropfenweise wurde Triethylamin (2,85 g; 28,16 mmol) zugesetzt, wobei weiter 30 min gerührt wurde. Diese Reaktion führte zum Aldehyd **5** (Gruseck und Heuschmann, 1990), das sofort – ohne es zu isolieren- bei -78°C dem n-Tridecylphosphoran **7** zugefügt wurde. [Letzteres wurde erhalten durch Zugabe von n-Butyllithium (1,4 M; 14 mL; 20 mmol) bei Zimmertemperatur zu n-Tridecylphosphonium -Bromid **6** (11,50 g; 21,90 mmol) (Kumar und Dev, 1987), gelöst in 20 mL Tetrahydrofuran]. Nachdem die Lösung langsam, im Laufe von 10-15 Stunden, auf Zimmertemperatur erwärmt wurde, wurde sie in eine halb-gesättigte Lösung von Ammoniumchlorid (100 mL) gegossen, mit Ethylether (4 x 30 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel ($25^\circ\text{C}/15$ mmHg) wurde die

Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO₂; Hexan) und das Olefin **8** erhalten (1,305 g; 4,24 mmol; Ausbeute : 45 %).

Olefin 8 : C₂₀H₃₆O₂, farblose Flüssigkeit; lt. Elementaranalyse in %: C: 77,87; H: 11,76; erhalten wurde: C: 77,5; H: 11,8; IR (CCl₄) : 2926 (s); 2854 (s); 1538 (m); 1466 (m); 1273 (s) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,60-5,30 (2H, m, -CH=CH-); 4,00-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,40 [1H, q, J~7,5 Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,40-2,10 [2H, m, -CH₂-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 1,60-1,15 (24H, m); 0,88 [3H, tl, J~7 Hz, CH₃(CH₂)₁₃] ppm.

Dioxolan 9

Das Olefin **8** (743 mg; 2,41 mmol) wurde in 15 mL Essigsäure, die 5 mg Platinoxid enthielt, gelöst. Die Lösung wurde unter Wasserstoffatmosphäre (45 bar) gestellt, 8 Stunden bei 50°C erwärmt und dann durch Celit filtriert. Nach Zugabe von 20 mL Wasser und Extraktion mit Hexan (4 x 10 mL) wurden die 4 vereinten organischen Extrakte zunächst mit einer gesättigten Lösung von Natriumbicarbonat (2 x 20 mL), danach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung (20 mL) gewaschen, getrocknet über Magnesiumsulfat und filtriert. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg) wurde diese Reaktionsmischung für die nächste Reaktionsstufe verwendet (Dioxalan **9**: 748 mg; 2,41 mmol; 100 % Ausbeute).

Dioxolan 9 : C₂₀H₃₈O₂, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 77,36; H: 12,33; erhalten wurde: C: 77,4; H: 12,5; IR (CCl₄) : 2925 (s); 2854 (s); 1538 (m); 1466 (m); 1273 (s) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 4,00-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,60-2,40 [1H, m, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,15-2,05 [2H, m, -CH₂-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 1,90-1,70 (1H, m); 1,60-1,15 (27H, m); 0,88 [3H, tl, J~7 Hz, CH₃(CH₂)₁₃] ppm.

2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB)

Zu Dioxalan **9** (748 mg; 2,41 mmol), gelöst in 20 mL Tetrahydrofuran, wurden 10 mL 10 %ige Salzsäure zugegeben. Die Mischung wurde 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt, auf Zimmertemperatur abgekühlt und danach in 50 mL gesättigter Natriumbicarbonatlösung gegeben. Nach Extraktion mit Diethylether (3 x 30 mL), Trocknen der Extrakte über Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg), wurde das Rohprodukt durch Silikagel-Chromatographie (30 g SiO₂, Hexan) gereinigt und 2-Tetradecylcyclobutanon erhalten (616 mg; 2,31 mmol; Ausbeute: 95 %).

2-Tetradecylcyclobutanon : C₁₈H₃₄O, farblose Kristalle (F = 37°C); lt. Elementaranalyse in %: C: 81,13; H: 12,86; erhalten wurde: C: 81,3; H: 13,0; IR (CCl₄) : 2926 (s); 2854 (s); 1783 (s); 1466 (m); 1088 (w) cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 3,40-3,20 (1H, m, -CH-CO-); 3,20-2,80 (2H, m, -CH₂-CO-); 2,18 (1H, ddd, J~6 Hz, 10 Hz, 15 Hz, -CH-CH₂-CO-); 1,80-1,35 (3H, m); 1,25 (24H, sl); 0,88 [3H, tl, J~7Hz, CH₃(CH₂)₁₃] ppm.

Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer mono-ungesättigten Alkylkette.

Beschrieben wird die Synthese des 2-(Tetradec-5'-enyl)cyclobutanons (2-tDeCB). Für die Herstellung des 2-Dodecenylcyclobutanons (2-dDeCB) wurde anstelle von n-Nonyltriphenylphosphonium-Bromid das Salz n-Heptyltriphenylphosphonium-Bromid eingesetzt.

Olefin 12

DMSO (880 mg; 11,26 mmol) wurde zu 1,43 g (11,26 mmol) Oxalyl-chlorid (gelöst in 10 mL Dichlormethan) bei -78°C hinzugegeben. Die Mischung wurde 10 min bei -78°C gerührt, und dann der Alkohol **4** (1,35g; 9,38 mmol) (Kirmse and Schneider, 1969) tropfenweise zugegeben. Diese Mischung wurde jetzt 30 min bei -78°C gerührt. Tropfenweise wurde Triethylamin (2,85 g; 28,16 mmol) zugesetzt, wobei weiter 30 min gerührt wurde. Diese Reaktion führte zum Aldehyd **5** (Gruseck und Heuschmann, 1990), das sofort – ohne es zu isolieren - bei -78°C dem Phosphoran **11** zugefügt wurde. [Letzteres wurde erhalten durch Zugabe von Lithium bis(trimethylsilyl)amid (1 M in Tetrahydrofuran; 23 mL; 23 mmol) bei Zimmertemperatur zu n-Nonyl-triphenyl-phosphonium-Bromid **10** (Clark *et al.*, 1962) (9,70 g; 21,30 mmol), gelöst in 20 mL Tetrahydrofuran]. Nachdem die Lösung langsam, im Laufe von 10-15 Stunden, auf Zimmertemperatur erwärmt wurde, wurde sie in eine halb-gesättigte Lösung von Ammoniumchlorid (100 mL) gegossen, mit Diethylether (4 x 30 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel ($25^{\circ}\text{C}/15$ mmHg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO_2 ; Hexan), und das Olefin **12** erhalten (1,141 g; 4,75 mmol; Ausbeute : 51 %).

Olefin 12 : $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_4$, farblose Flüssigkeit; lt. Elementaranalyse in %: C: 64,98; H: 8,39; erhalten wurde: C: 65,1; H: 8,5; IR (CCl_4) : ν (C=O) : 1733 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 5,63-5,33 (2H, m, $\text{CH}=\text{CH}$); 4,05 (2H, q, $J\sim 7$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 3,98-3,77 (4H, m, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 3,35 (1H, q, $J\sim 8,6$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$); 2,46-2,15 (6H, m); 1,90 (1H, td, $J\sim 5$ Hz, 11 Hz); 1,50 (1H, dd, $J\sim 9$ Hz, 11 Hz); 1,25 (3H, t, $J\sim 7$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

Ester 13

Das Olefin **12** (617 mg; 2,57 mmol) wurde in 15 mL Essigsäure, die 5 mg Platinoxid enthielt, gelöst. Die Lösung wurde unter Wasserstoffatmosphäre (45 bar) gestellt, 7 Stunden bei 50°C erwärmt und dann durch Celit filtriert. Nach Zugabe von 20 mL Wasser und Extraktion mit Dichlormethan (4 x 10 mL) wurden die 4 vereinten organischen Extrakte zunächst mit einer gesättigten Lösung von Natriumbicarbonat (2 x 20 mL), danach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung (20 mL) gewaschen, getrocknet über Magnesiumsulfat und filtriert. Nach Entfernen der Lösungsmittel ($25^{\circ}\text{C}/15$ mmHg) wurde die Reaktionsmischung direkt mit Ethylenglykol (186 mg; 3,00 mmol) in Benzen (50 mL) in Gegenwart von Paratoluensulfonsäure (5 mg) versetzt und 3 Stunden unter Rückfluß (Dean-Stark) erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde zu einer halb-gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung (40 mL) hinzugegeben, mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert, mit einer gesättigten Lösung von Natriumbicarbonat (20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel ($25^{\circ}\text{C}/15$ mmHg) wurde die Reaktionsmischung (747 mg) durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO_2 ; Hexan), und der Ester **13** erhalten (545 mg, 2,25 mmol; Ausbeute : 86 %).

Ester 13 : $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_4$, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 64,44; H: 9,15; erhalten wurde: C: 64,2; H: 9,0; IR (CCl_4) : ν (C=O): 1733 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 4,12 (2H, q, $J\sim 7$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$); 3,90-3,83 (4H, m, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$); 2,50 [1H, q, $J\sim 7,5$ Hz, $-\text{CH}-\text{C}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$]; 2,29 (2H, t, $J\sim 7,5$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{CO}_2-\text{C}_2\text{H}_5$); 2,18-2,10 (2H, m); 1,90-1,15 (8H, m); 1,25 (3H, t, $J\sim 7$ Hz, $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm.

Alkohol 14

Zum Ester **13** (1,465 g; 6,05 mmol), gelöst in 30 mL Tetrahydrofuran, wurde bei 0°C Lithiumaluminiumhydrid (820 mg; 8,47 mmol) hinzugegeben. Das Eisbad wurde entfernt, und nach 15 min Rühren bei 25 °C wurde die Reaktionsmischung hydrolysiert (335 µl Wasser, danach 335 µl 15% iges Natriumhydroxid, dann wieder 1007 µl Wasser). Es wurde über Celit filtriert, das Filtrat gewaschen mit Dichlormethan (4 x 20 mL) und getrocknet über Magnesiumsulfat. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg) wurde die Reaktionsmischung (1,457 g) durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO₂; 15 % Ethylacetat / Hexan), und der Alkohol **14** erhalten (1,150 g; 5,75 mmol; Ausbeute: 95 %).

Alkohol 14 : C₁₁H₂₀O₃, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 65,97; H: 10,07; erhalten wurde: C: 66,1; H: 9,8; ¹H-NMR (CDCl₃) : 3,95-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,62 (2H, t, J~7 Hz, -CH₂-OH); 2,52 [1H, q, J~7,5 Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,20-2,10 (2H, m); 1,90-1,15 (11H, m) ppm.

Aldehyd 15

Zum Alkohol **14** (700 mg; 3,50 mmol) in 15 mL Dichlormethan-Lösung wurde bei 25°C Pyridiniumchlorochromate (1,51 g; 7,00 mmol), suspendiert in 70 mL Dichlormethan, zugegeben. Nach 1 Stunde Rühren wurde die Lösung mit 150 mL Diethylether verdünnt. Nach Filtration über Celit und Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO₂; 15% Ethylacetat / Hexan), und das Aldehyd **15** erhalten (638 mg; 3,22 mmol; Ausbeute: 92%).

Aldehyd 15 : C₁₁H₁₈O₃, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 66,64; H: 9,15; erhalten wurde: C: 66,8; H: 9,4; ¹H-NMR (CDCl₃) : 9,76 (1H, t, J~2 Hz, -CHO-); 3,95 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,55-2,35 (3H, m); 2,20-2,05 (2H, m); 1,85-1,20 (8H, m) ppm.

Olefin 18

Zum n-Nonyltriphenylphosphonium-Bromid (3,32 g; 7,08 mmol), gelöst in 60 mL Tetrahydrofuran, wurde bei 25°C tropfenweise n-Butyllithium (1,42 M; 5,23 mL; 7,43 mmol) hinzugegeben. Nach einer Stunde Rühren bei 25°C wurde der Aldehyd **15** (638 mg; 3,22 mmol), gelöst in 15 mL Tetrahydrofuran, tropfenweise zugegeben. Nach 30 Min. Rühren bei 25 °C wurde die Reaktionsmischung hydrolysiert mittels einer halb-gesättigten Ammonium-chlorid-Lösung (80 mL). Danach wurde mit Diethylether (4 x 25 mL) extrahiert, mit 50 mL Wasser gewaschen, mit 50 mL einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (80 g SiO₂; Hexan), und das Olefin **18** erhalten (517 mg; 1,68 mmol; Ausbeute: 52 %).

Olefin 18 : C₂₀H₃₆O₂, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 77,87; H: 11,76; erhalten wurde: C: 78,0; H: 11,6; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,43-5,27 (2H, m, -CH=CH-); 3,98-3,80 (4H, m, -O-CH₂-CH₂-O-); 2,52 [1H, q, J = Hz, -CH-C(-O-CH₂-CH₂-O-)]; 2,27-1,90 (5H, m); 1,85-1,72 (1H, m); 1,65-1,05 (20H, m); 0,87 [3H, t, J = 7 Hz, CH₃(CH₂-)₇] ppm.

2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB)

Zum Olefin **18** (500 mg; 1,62 mmol), gelöst in 75 mL Tetrahydrofuran, wurden 30 mL 10 %ige Salzsäure gegeben. Nach 3-stündiger Reaktion bei 30°C wurde die Reaktionsmischung

mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung neutralisiert. Danach wurde mit Diethylether (3 x 75 mL) extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mmHg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (30 g SiO₂; Hexan), und das 2-(Tetradec-5'-enyl)cyclobutanon erhalten (428 mg; 1,62 mmol; Ausbeute: 100 %).

2-Tetradecenylcyclobutanon : C₁₈H₃₂O, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 81,75; H: 12,20; erhalten wurde: C: 81,7; H: 12,3; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1779 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,43-5,26 (2H, m, -CH=CH-); 3,40-3,17 (1H, m, -CH-CO-); 3,13-2,81 (2H, m, -CH₂-CO-); 2,27-1,85 (5H, m); 1,75-1,15 (1H, m); 1,65-1,05 (19H, m); 0,87 [3H, t, J~7 Hz, CH₃(CH₂)₁₃] ppm.

* Zweiter Syntheseweg

Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer gesättigten Alkylkette

Hydrazon 20

Zu einer Lösung von Cyclobutanon **19** (4,773 g, 68,18 mmol) in 100 mL Benzen wurden N, N- Dimethylhydrazin (4,91 g, 81,82 mmol) und Trifluoressigsäure (0,05 mL) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 5 Stunden unter Rückfluß (Dean-Stark) erhitzt. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurden nacheinander 100 mL Diethylether und 40 mL Wasser zugegeben. Die organische Phase wurde extrahiert, mit einer gesättigten Natriumchloridlösung (2 x 20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C, 20 mm Hg) wurde die Reaktionsmischung bei Unterdruck destilliert und das Hydrazon **20** erhalten. (Siedepunkt: 53°C/25mmHg; 4,216 g, 37,64 mmol; Ausbeute: 55%). Die spektroskopischen Daten des isolierten Hydrazons **20** stimmten mit denen in der Literatur (Mino *et al.*, 1997) überein.

2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB)

Zu einer Lösung von Hydrazon **20** (900 mg, 8,02 mmol) in 100 mL Tetrahydrofuran wurde bei -5°C tropfenweise n-Butyllithium (1,6M Lösung in Hexan; 7,26 mL) zugegeben. Nach 1 Stunde Rühren bei -5°C wurde 1-Bromo-Tetradecan (2,30 g, 8,30 mmol) zugesetzt. Danach wurde die Reaktionsmischung 20 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, 20 mL 2N HCl zugesetzt und weiter 1 Stunde gerührt. Die organische Phase wurde extrahiert mit Diethylether (3 x 20 mL), nacheinander mit Wasser (3 x 20 mL) und einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (2 x 20 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C / 15 mm Hg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (30 g SiO₂; Hexan), und das 2-Tetradecyl-cyclobutanon erhalten (1,377 g, 5,17 mmol; Ausbeute: 64 %).

Die Synthese der anderen 2-ACB verlief nach dem gleichen Verfahren, indem Alkylhalogenide mit entsprechenden Seitenketten verwendet wurden.

Synthese der 2-Alkylcyclobutanone mit einer mono-ungesättigten Alkylkette

Aldehyd 24

Das 5-Bromo-pentanol-1 **23** wurde nach der Methode von Chong *et al.* (2000) hergestellt. Zu einer Suspension von Pyridiniumchlorochromat (7,8 g, 0,036 mol) in 300 mL CH₂Cl₂ wurde

tropfenweise 5-Bromo-pentanol-1 **23** (3,0 g, 0,018 mol in 30 mL CH₂Cl₂) gegeben. Nach 1 Stunde Rühren bei Zimmertemperatur wurde die Reaktionslösung in 500 mL Diethylether gegeben und danach über Celit filtriert. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C/15 mm Hg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO₂; Hexan - 10 % Ethylacetat), und der Aldehyd **24** erhalten (2,1 g, 12,72 mmol, Ausbeute 70 %).

Aldehyd 24 : C₅H₉BrO, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 36,39; H: 5,50; erhalten wurde: C: 36,5; H: 5,28; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 9,77 (1H, t, J = 1,5Hz, CH_O); 3,40 (2H, t, J = 7 Hz, CH₂Br); 2,50 (2H, td, J = 7 Hz, 1,5Hz, CH₂CHO); 2,00-1,20 (4H, m).

Olefin 26

Zu einer Suspension von n-Nonyltriphenylphosphonium-Bromid (6,54 g, 13,9 mmol) in 270 mL Tetrahydrofuran wurde bei Zimmertemperatur tropfenweise n-Butyllithium (1,51M Lösung in Hexan; 8,1 mL, 12,20 mmol) zugegeben. Die Farbe der Lösung änderte sich von farblos zu dunkelrot. Nach 10 Minuten Rühren bei Zimmertemperatur wurde der Aldehyd **24** (1,917 g, 11,60 mmol), gelöst in 20 mL Tetrahydrofuran, tropfenweise zugegeben. Nach 20 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wurden nacheinander 200 mL gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung, 200 mL Wasser und 150 mL Diethylether zugesetzt. Danach wurde mit Diethylether (2 x 100 mL) extrahiert, mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung (150 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel (25°C / 15 mm Hg) wurde die Reaktionsmischung durch Silikagel-Chromatographie gereinigt (60 g SiO₂; Hexan), und das Olefin **26** erhalten (2,594 g, 9,43 mmol, Ausbeute: 81 %, Gemisch der Isomere *cis* / *trans*: 85 / 15).

Olefin 26 : C₁₄H₂₇Br, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 61,09; H: 9,89; erhalten wurde: C: 60,9; H: 10,0; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,22 (2H, m, CH=CH); 3,47 (2H, t, J = 7 Hz, CH₂Br); 2,20-1,80 (6H, m); 1,60-1,40 (2H, m); 1,40-1,30 (12H, m); 0,91 (3H, t, J = 7 Hz, CH₃).

Olefin **25** wurde durch das gleiche Verfahren erhalten, nur wurde n-Heptyltriphenylphosphonium-Bromid eingesetzt (Ausbeute : 80 %).

Olefin 25 : C₁₂H₂₃Br, farblose Flüssigkeit, lt. Elementaranalyse in %: C: 58,30; H: 9,38; erhalten wurde: C: 58,1; H: 9,5; IR (CCl₄) : ν (C=O): 1730 cm⁻¹; ¹H-NMR (CDCl₃) : 5,22 (2H, m, CH=CH); 3,47 (2H, t, J = 7 Hz, CH₂Br); 2,20-1,80 (6H, m); 1,60-1,40 (2H, m); 1,40-1,30 (8H, m); 0,91 (3H, t, J = 7 Hz, CH₃).

2-Dodecenylcyclobutanon (2-dDeCB) und 2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB).

2-Dodecenylcyclobutanon and 2-Tetradecenylcyclobutanon wurden erhalten indem im oben beschriebenen Verfahren die Olefine **25** und **26** eingesetzt wurden. Ausgehend von Hydrazon **20** (200 mg, 1,79 mmol) wurde eine Ausbeute von 71 % 2-Dodecenylcyclobutanon erzielt (302 mg, 1,28 mmol). Ähnlich wurde ausgehend von Hydrazon **20** (462 mg, 4,13 mmol) eine Ausbeute von 69 % 2-Tetradecenylcyclobutanon erzielt (755 mg, 2,85 mmol).

Die spektroskopischen Daten der isolierten 2-Alkylcyclobutanone stimmten mit denen in der Literatur überein.

* Synthese von 5-Tetradecyl-oxolan-2-on (oder γ -Stearolacton)

Das Oxidationsprodukt von 2-Tetradecyl-cyclobutanon, nämlich das 5-Tetradecyl-oxolan-2-on (oder γ -Stearolacton), wurde nach der Methode von Granata *et al.* (1994) hergestellt.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau M. Wittmann, Frau A. Perez, Frau L. Miesch und Herrn J. Montalt für ihre Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Boyd R. D., Crone A. V. J., Hamilton J. T. G., Hand M. V., Stevenson M. H., Stevenson P. J. (1991) Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 789-792.

Chong, J. M., Heuft, M.A.; Rabbat, P. (2000) Solvent effects on the monobromination of α , ω -diols: a convenient preparation of ω -bromoalkanols. *J. Org. Chem.*, **65**, 5837-5838.

Corey, E. J., Suggs, J. W. (1975) Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 2647-2650.

Crone A. V. J., Hand M. V., Hamilton J. T. G., Sharma N. D., Boyd D. R., Stevenson M. H., (1993) Synthesis, characterization and use of 2-tetradecylcyclobutanone together with other cyclobutanones as markers of irradiated liquid whole egg. *J. Sci. Food Agr.*, **62**, 361-367.

Granata, A., Sauriol, F., Perlin, A. S. (1994) Acid-catalysed transformation of oleic acid, and 12-hydroxystearic acid, into γ -octadecanolactone. Evidence for occurrence of a novel side reaction. *Can. J. Chem.*, **72**, 1684-1690.

Gruseck, U., Heuschmann, M. (1990) Preparation of donor-acceptor substituted vinylcyclobutanes. *Chem. Ber.*, **123**, 1905-1909.

Hamilton L., Stevenson M. H., Boyd D. R., Brannigan I. N., Treacy A. B., Hamilton J. T. G., McRobert W. C., Elliot C. T. (1996) Detection of 2-substituted cyclobutanones as irradiation products of lipid-containing foods: synthesis and applications of *Cis*- and *Trans*-2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanones and 11-(2'-oxocyclobutyl)-undecanoic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 139-146.

Kirmse, W., Schneider, S. (1969) Eliminierungsreaktionen an 2-tosyloxymethyl-cycloalkanon acetalen. *Chem. Ber.*, **102**, 2440-2448.

Kumar, V., Dev, S. (1987) Chemistry of ayurvedic crude drugs. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 5933-5948.

Miesch M., Ndiaye B., Hasselmann C., Marchioni E. (1999) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. I. Synthesis of saturated and unsaturated standards. *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.

Mino, T., Masuda, S., Nishio, M., Yamashita, M. (1997) Synthesis of lactones by Baeyer-Villiger oxydation with magnesium monophtalate hexahydrate. *J. Org. Chem.*, **62**, 2633-2635.

2.2. TRENNUNG DER *CIS*- UND *TRANS*- ISOMERE DES 2-TETRADECENYL-CYCLOBUTANONS

Eric Marchioni und Péter Horvatovich

Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

Eine Reihe von 2-Alkylcyclobutanonen, das 2-Dodecylcyclobutanon (2-dDCB), das 2-Dodecenylcyclobutanon (2-dDeCB, ein Gemisch von *cis*- und *trans*-), das 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB), das Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB, ein Gemisch von *cis*- und *trans*-), *cis*-2-tDeCB und *trans*-2-tDeCB, sollten als Prüfsubstanzen eingesetzt werden. Diese Wahl ermöglicht es, den Einfluß einer Doppelbindung in der Alkylkette (2-dDCB / 2-dDeCB, 2-tDCB / 2-tDeCB) sowie auch den Einfluß von *cis-trans*-Isomerisierung (*cis*-2-tDeCB / *trans*-2-tDeCB) auf die Toxizität der Substanzen zu untersuchen. *Trans*-2-tDeCB wird nicht während der Bestrahlung gebildet, kann jedoch durch eine Isomerisierung der *cis*-Form der Fettsäuren entstehen, z.B. durch Erhitzung des Lebensmittels vor einer Bestrahlung.

Die im vorigen Abschnitt beschriebene Synthese ermöglicht es nicht, die reinen Isomere *cis*- und *trans*-2-tDeCB herzustellen. Die einzige Synthese, die bisher für *cis*-2-tDeCB veröffentlicht wurde, hat eine äußerst niedrige Ausbeute (1%) (Hamilton *et al.*, 1995) und konnte nicht genutzt werden, um ausreichende mg-Mengen für die toxikologischen Studien herzustellen. Deshalb mußten, ausgehend vom *cis*- und *trans*-Gemisch des 2-tDeCB, die einzelnen Isomere *cis*-2-tDeCB und *trans*-2-tDeCB fraktioniert werden.

Diese Trennung wurde durch eine Festphasen-Extraktion auf einem mit Silberionen imprägnierten Kationenaustauscher durchgeführt, ein Verfahren, das bereits für die Trennung von 2-Alkyl-cyclobutanonen mit gesättigten und ungesättigten Alkylketten (Ndiaye *et al.*, 1999a) sowie auch für die Trennung von *cis*- und *trans*-Formen von Ölsäuremethylester eingesetzt wurde (Ulberth und Achs, 1990).

Der Kationenaustauscher SCX (Benzol-sulfonsäure, 50 µm, Kat.-Nr: 9530-0025) wurde von International Sorb Technology Ltd (Mid Glamorgan, Groß Britannien) bezogen. 4 g dieses Austauschers wurden auf die Fritte einer Glassäule (200 mm Länge, 22 mm Durchmesser, mit Hahn, Volumen etwa 130 ml, und mit Alu-Folie umwickelt) aufgebracht und anschließend mit 40 ml einer wäßrigen, 1 %igen Ammoniumacetat-Lösung (Kat.-Nr: 1116, Merck) und 40 ml dest. Wasser konditioniert. Durch Zugabe von 8 ml einer wäßrigen, 1 %igen Silbernitrat-Lösung (Kat.-Nr. S-6506, Sigma) wurde der Austauscher mit Ag⁺-Ionen beladen. Danach wurde die Säule gewaschen mit 10 ml Methanol (Kat.-Nr. 525102, Carlo Erba, Rodano, Italien), gefolgt von 10 ml TBME (Kat.-Nr. 1.01845.2500, Merck) und 10 ml n-Hexan (durch Destillation gereinigt).

Sechs mg 2-tDeCB (*cis* / *trans* -Gemisch) gelöst in Hexan, wurden auf den mit Silber-Ionen beladenen Kationen-Austauscher aufgebracht. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine solche Säule eine maximale Menge von 8 mg 2-tDeCB aufnehmen konnte. Die Eluierung fand mit Lösungsmittel zunehmender Polarität statt:

- 30 ml n-Hexan/TBME (90:10 v/v) (Fraktion 1)
- 6 × 20 ml n-Hexan/TBME (88:12 v/v) (Fraktion 2 bis 7)
- 2 × 50 ml TBME (Fraktion 8 bis 9)

N.B. Wenn die Säule nach Gebrauch mit 50 ml TBME gewaschen und durch Alu-Folie von Licht abgeschirmt wurde, um eine Reduktion der Silberionen zu verhindern, konnte sie bis zu 6 x wiederverwendet werden

Die Fraktionen wurden in 100 ml Flachbodenkolben gesammelt. Zu jeder Fraktion wurden 200 µl einer Lösung von 2-Octylcyclobutanon (2-OCB), in einer Konzentration von 0,5 µg·ml⁻¹ als interner Standard zugegeben. 1 µl von diesem Gemisch wurde analysiert durch GC-MS mittels eines Varian Gaschromatographen (Typ 3300, Palo Alto, California, USA), ausgestattet mit einem Flammen-Ionisationsdetektor (300°C) und Injektionsmodus: Split-splitlos. Die Injektionstemperatur war 250°C, der Modus splitlos wurde für 0,75 Minuten eingesetzt, danach wurde während der ganzen Analyse mit dem Modus Split gearbeitet. Eine DB-5 Kapillar-Säule, 30 m x 0,25 mm i.d. mit einer 0,25 µm stationären Phase (5 % Diphenyl-95 % Dimethylpolysiloxan) von J&W Scientific (Folsom, California, USA, Kat.-Nr. 122-5032) wurde verwendet. Die Anfangstemperatur im Säulenofen war 50°C während der ersten 2 Minuten. Die Heizrate war 8°C min⁻¹ bis 300°C. Die Endtemperatur wurde 5 Minuten konstant gehalten. Das Injektionsvolumen war 1 µl. Als Trägergas wurde Stickstoff von einer Reinheit von 99,999 % (Air Liquide, Paris La Défense, France), mit einer Flußrate von 1 ml/ min⁻¹ benutzt. Der Flammenionisationsdetektor wurde betrieben mit Wasserstoff (30 ml·min⁻¹) (Reinheit 99,999 %, Air Liquide) und einem Gemisch von Stickstoff-Sauerstoff (Reinheit 99,999 %, Air Liquide, 300 ml·min⁻¹). Als Make-up-gas wurde Stickstoff (30 ml·min⁻¹) (Reinheit 99,999 %, Air Liquide) verwendet. Der Prozentanteil der *cis*- und *trans*-Isomere in den Fraktionen ist in Abb. 6 dargestellt.

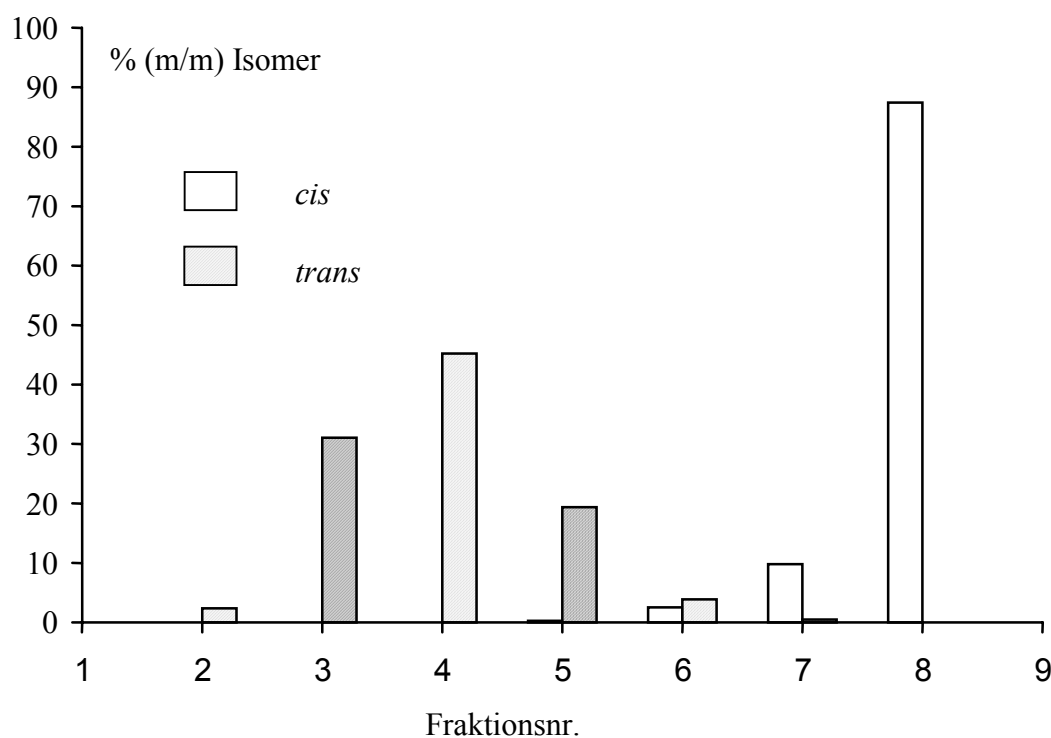


Abb. 6: Prozentanteile der *cis*- und *trans*-Isomere von 2-tDeCB in den verschiedenen Fraktionen nach Festphasen-Extraktion auf dem mit Silberionen imprägnierten Kationen-Austauscher.

Die Fraktionen 2, 3 und 4, die insgesamt 80 % des *trans*-2-tDeCB in der Probe enthielten, wurden addiert und danach konzentriert. Ebenso wurde mit den Fraktionen 7 und 8, die 97 % des *cis*-2-tDeCB enthielten, verfahren. Auch die Fraktionen 5 und 6 wurden aufkonzentriert und erneut einer Festphasen-Extraktion zugeführt. Diese Vorgangsweise ermöglichte eine bessere Ausbeute von *trans*-2-tDeCB, dessen Anteil in der Mischung gering ist. Diese Wiederholung der Festphasen-Extraktion (etwa 50 x) ermöglichte es, 44 mg *trans*-2-tDeCB (Reinheit 99 %) und 220 mg *cis*-2-tDeCB (Reinheit 98 %) aus einem Gemisch der beiden Isomere von 300 mg zu isolieren (damit war die Ausbeute 98 % für *trans*-2-tDeCB und 86 % für *cis*-2-tDeCB). Die Reinheit der beiden Isomere (Abb. 7) ist damit größer als die geforderten 95 % für toxikologische Studien.

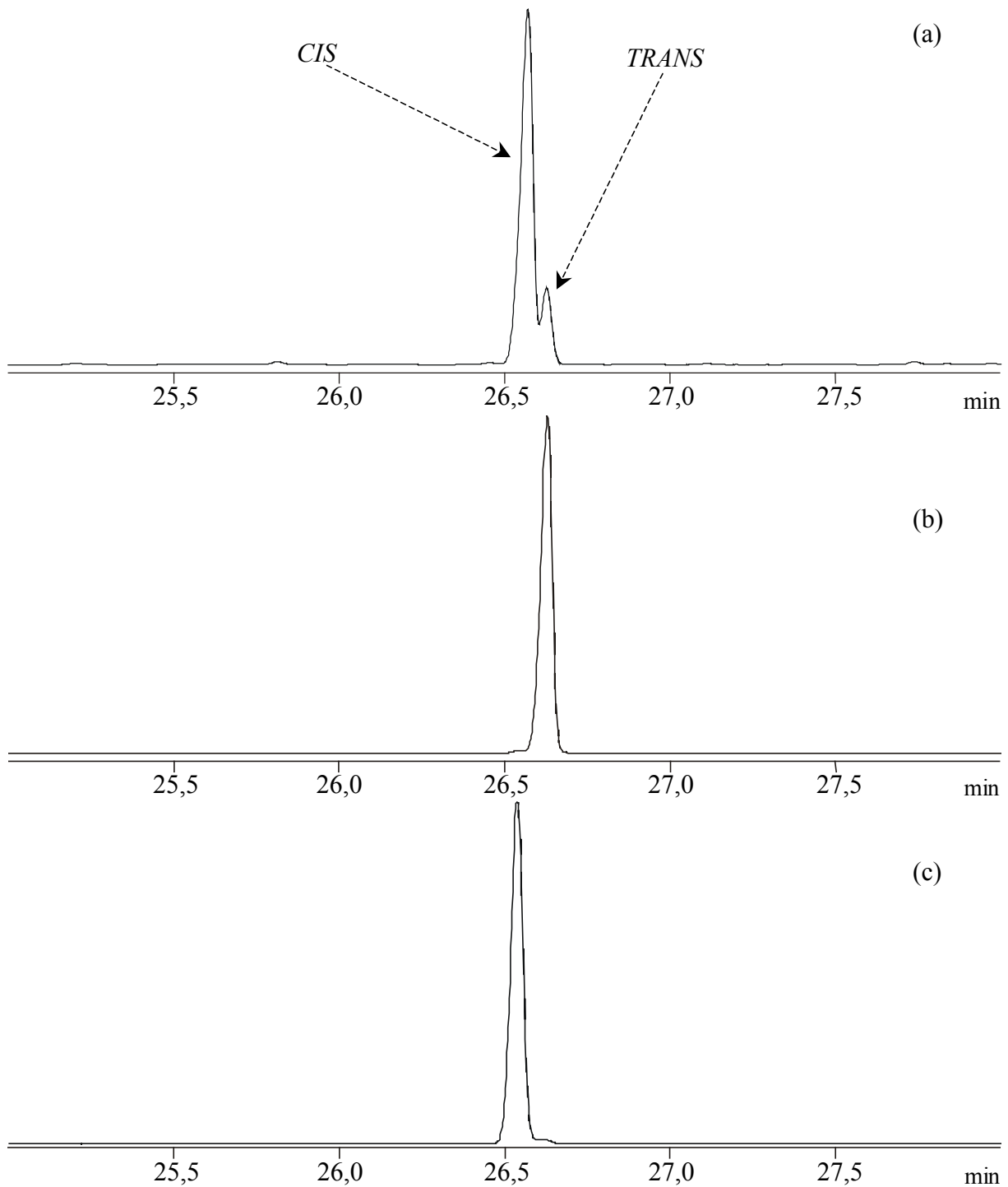


Abb. 7 : *GC/FID Analyse von einem Ausgangsgemisch des 2-tDeCB (a), des gereinigten trans-2-tDeCB (b) und cis-2-tDeCB (c), nach einer Festphasen-Extraktion über einen mit Silberionen imprägnierten Kationen-Austauscher.*

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Herrn M.M. El Idrissi für seine Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Hamilton, L., Stevenson, M. H., Boyd, D. R., Brannigan, I. N., Treacy, A. B., Hamilton, J. T. G., McRobert, W. C., Elliot, C. T. (1996) Detection of 2-substituted cyclobutanones as irradiation products of lipid-containing foods: synthesis and applications of *cis*- and *trans*-2-(tetradec-5'-enyl)-cyclobutanones and 11-(2'-oxocyclobutyl)-undecanoic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 139-146.

Ndiaye, B., Horvatovich, P., Miesch, M., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. III. Improvement of the field of application on the EN 1785 method by using silver ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **858**, 109-115.

Ulberth, F., Achs, E. (1990) Argentation chromatography of fatty acid methyl esters using silver-loaded solid-phase extraction columns. *J. Chromatogr.*, **504**, 202-206.

2.3 RADIOAKTIV MARKIERTE SUBSTANZEN

Es wurde überlegt, ein Tritium-markiertes 2-Tetradecylcyclobutanon herzustellen. Die Synthese einer solchen radioaktiv markierten Substanz erfordert jedoch eine Spezialausrüstung, die in unseren beteiligten Labors nicht vorhanden war. Es wurde deshalb ein Subkontrakt mit der französischen "Atomenergiekommission" in Saclay eingegangen. Diese Substanz wird für die Stoffwechseluntersuchungen bei IRCAD (UPR 9001) benötigt. IRCAD wird die erforderliche Menge (und spezifische Aktivität) festlegen. Jedoch aufgrund der Diskussion bei der Sitzung vom 2. April 2001, und auch wegen der Zeitknappheit bis zum Projektende, wurde die Synthese der radioaktiv-markierten Verbindungen nicht mehr in Betracht gezogen.

2.4 AUSLIEFERUNG DER PRÜFSUBSTANZEN

Eric Marchioni und Péter Horvatovich

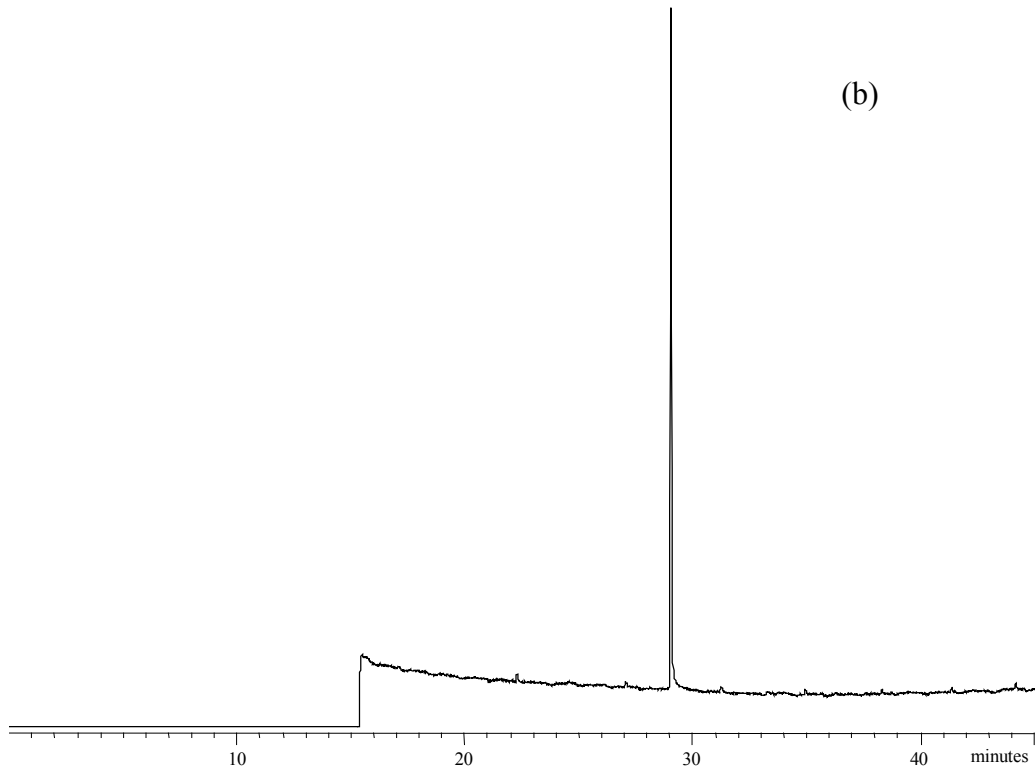
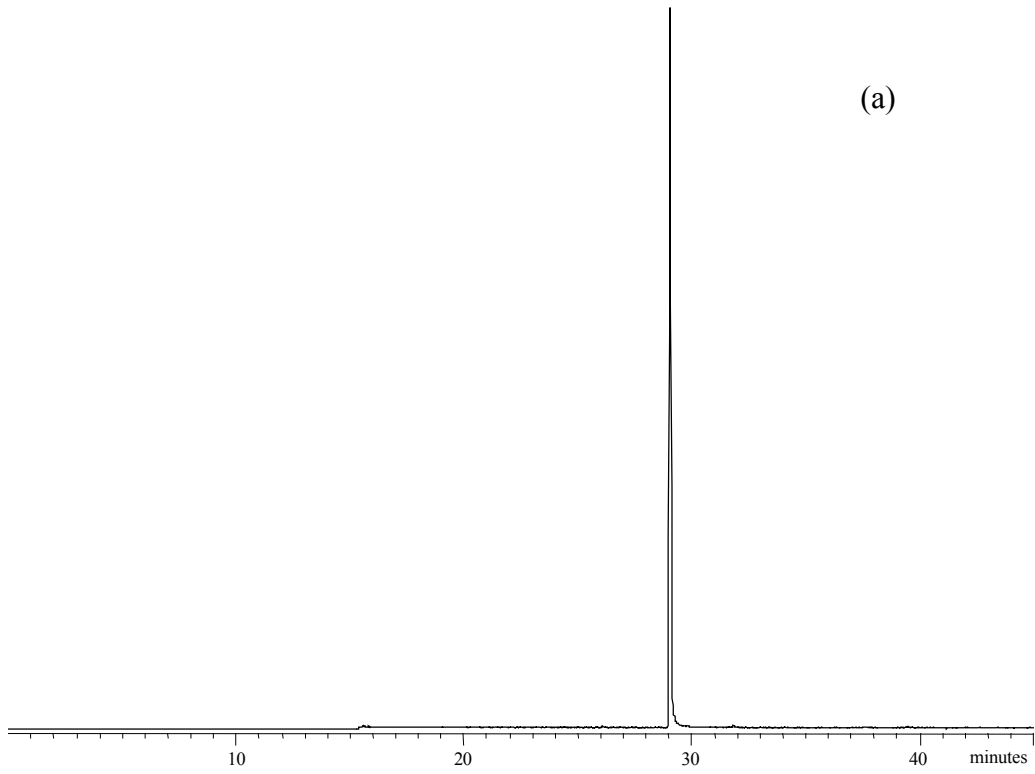
Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)
Université Louis Pasteur de Strasbourg

Seit Anfang des Forschungsprojektes wurde eine bedeutende Menge der Prüfsubstanzen im Labor für synthetische, organische Chemie (UMR 7509) der Universität Louis Pasteur, Straßburg hergestellt. Die Substanzen wurden in den einzelnen, am Forschungsprojekt beteiligten Labors, wie folgt verteilt:

Tabelle 1: *Auslieferung der Prüfsubstanzen.*

	CNRS	ULP	BFE	Uni KA	Total
2-DCB	0,26	4,8	0,5	0,08	5,64 g
2-dDCB	1,0	-	2,0	2,0	5,00 g
2-tDCB	1,5	8,1	1,5	1,5	12,60 g
2-tDeCB	0,5	3,7	1,76	1,5	7,46 g
γ -stearo-L	0,5	-	1,0	1,0	2,50 g
Gesamtmenge	3,76	16,6	6,76	6,08	33,20 g

Die hohe Reinheit (> 97 %) der Prüfsubstanzen ist in den Chromatogrammen und Massenspektren (Abb.8 - 12) dargestellt.



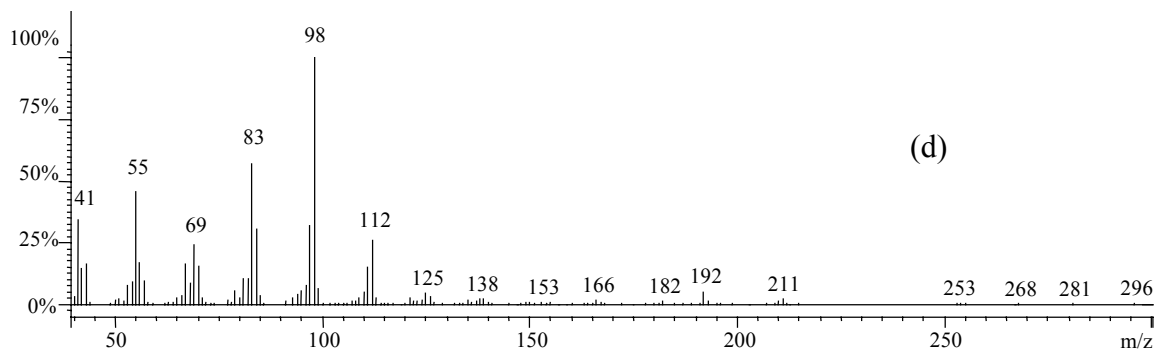
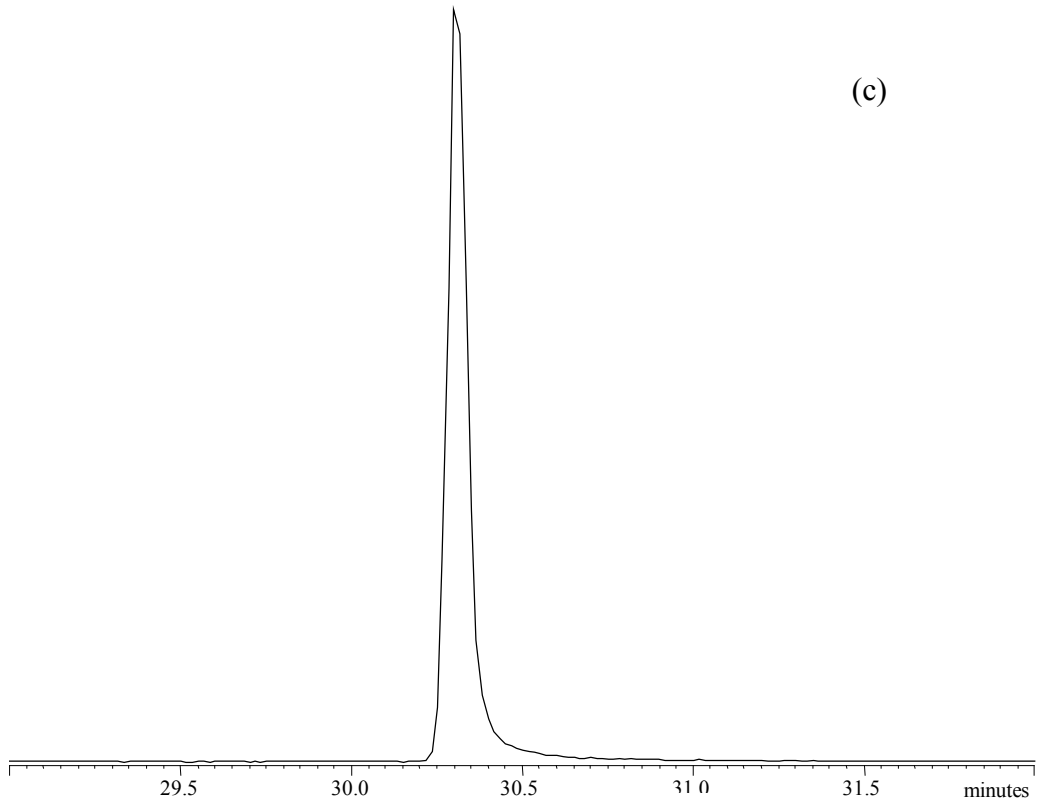
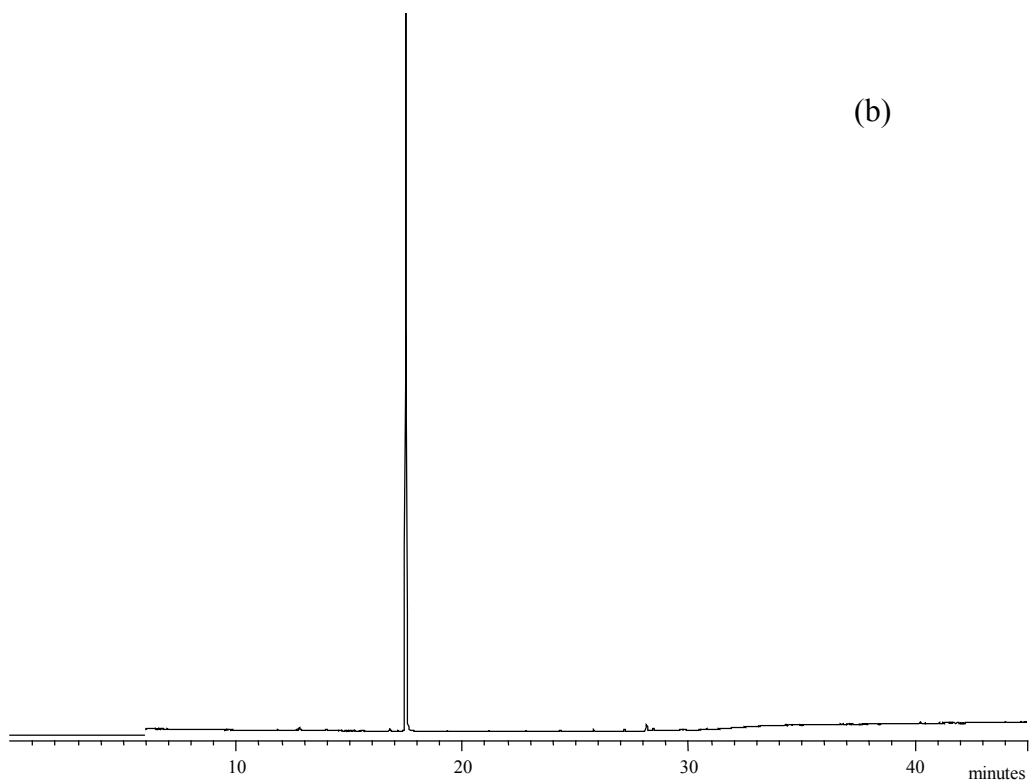
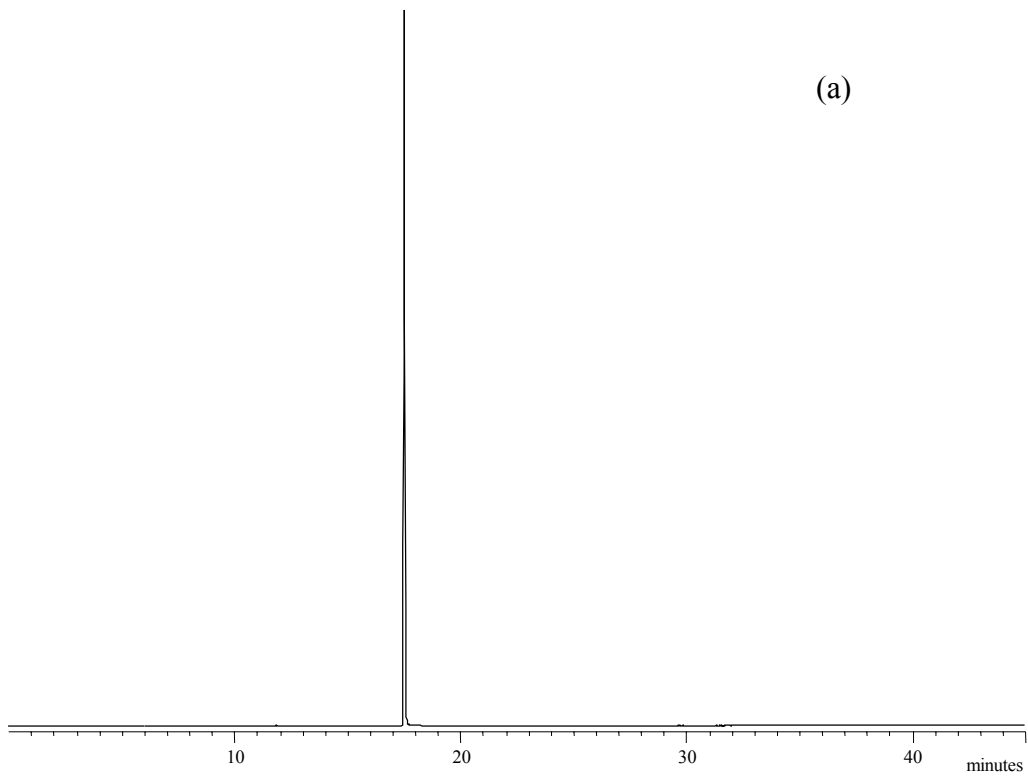


Abb. 8: *Chromatogramm [Ion $m/z=98$ (a), Totalionenstrom TIC (b und c)] des 2-Decyl-cyclobutanons (2-DCB) und dessen Massenspektrum (d).*



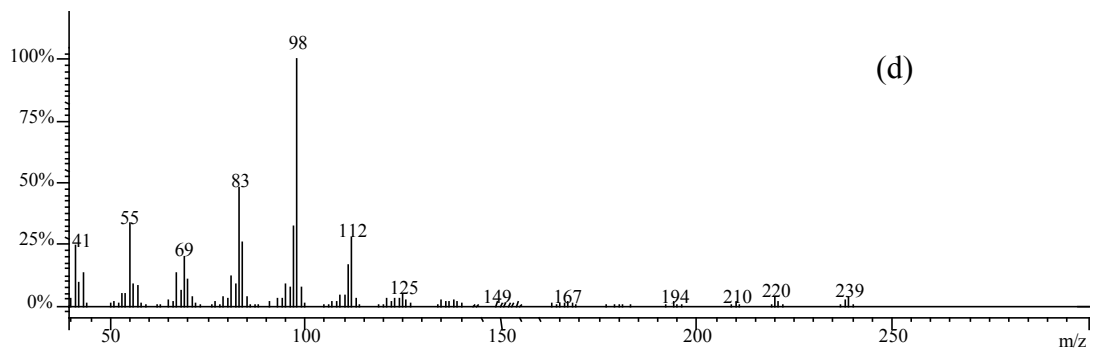
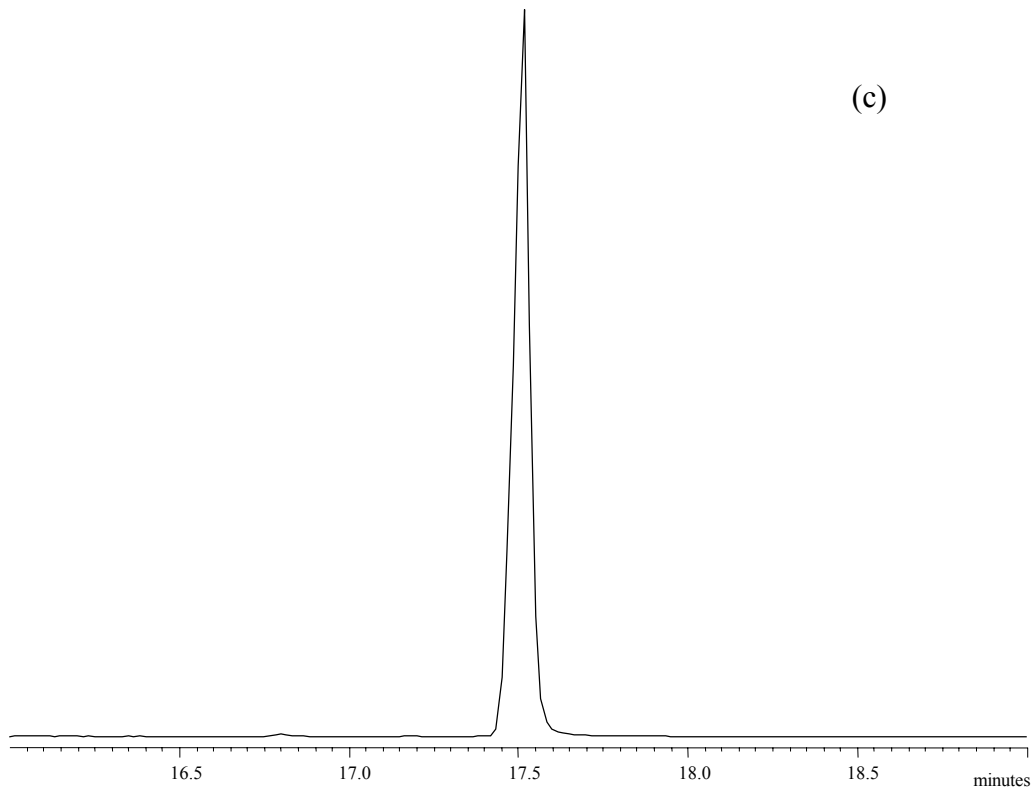
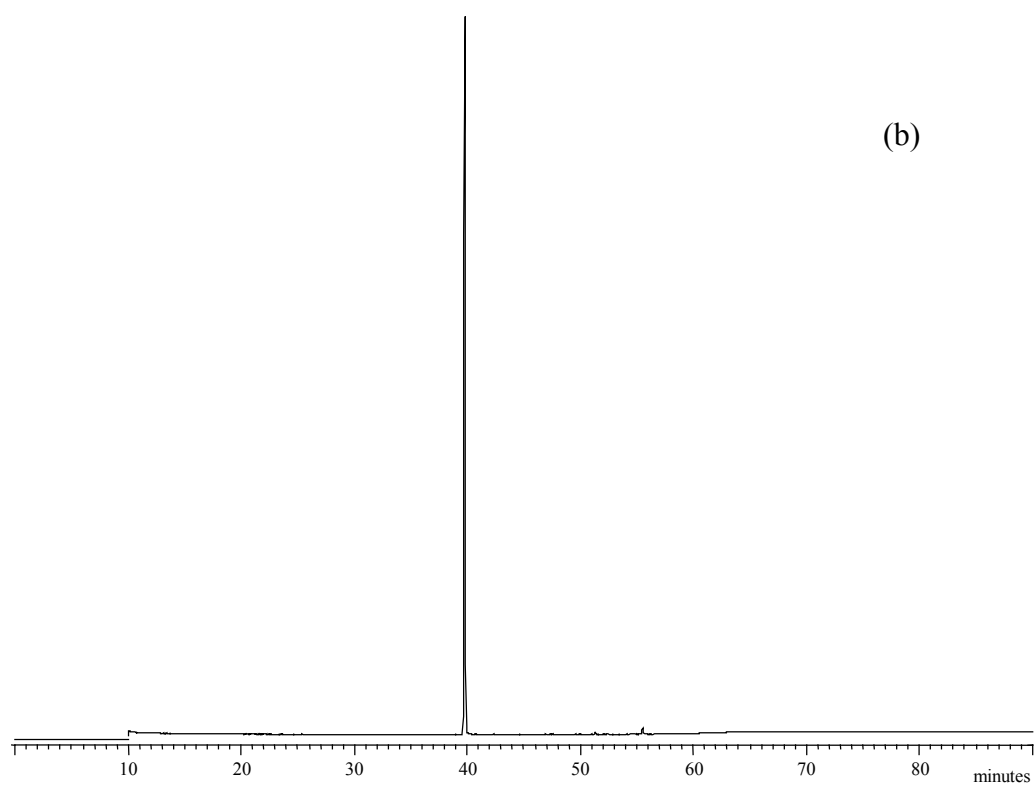
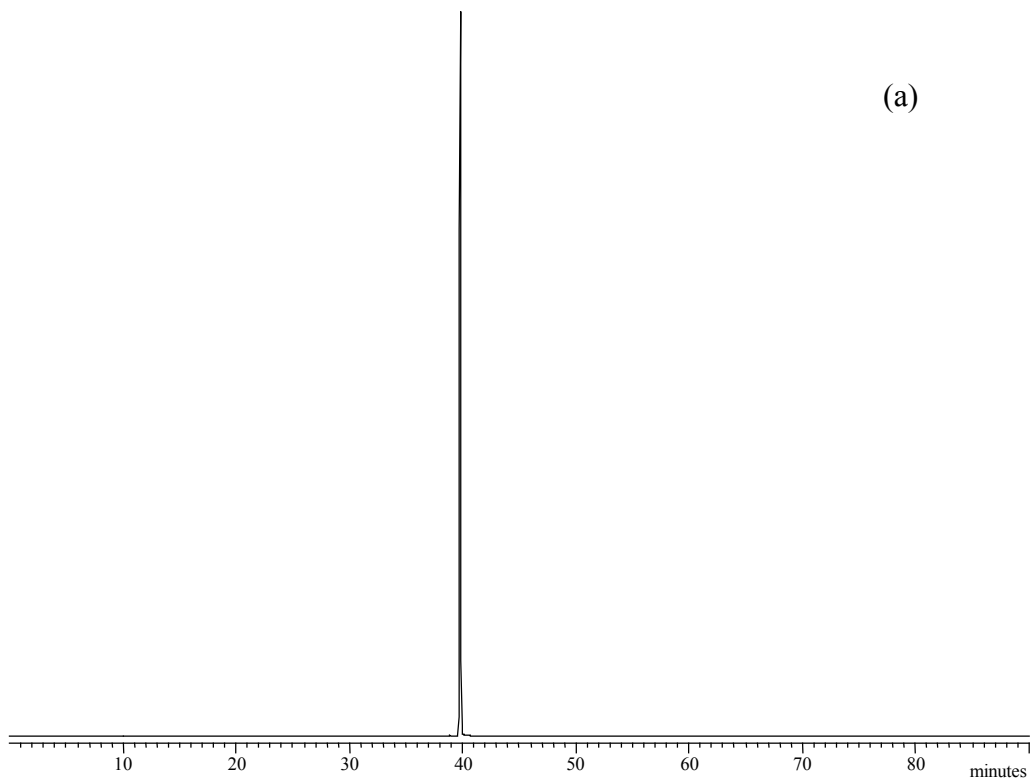


Abb. 9: *Chromatogramm [Ion $m/z=98$ (a), Totalionenstrom TIC (b und c)] des 2-Dodecyl-cyclobutanons (2-dDCB) und dessen Massenspektrum (d).*



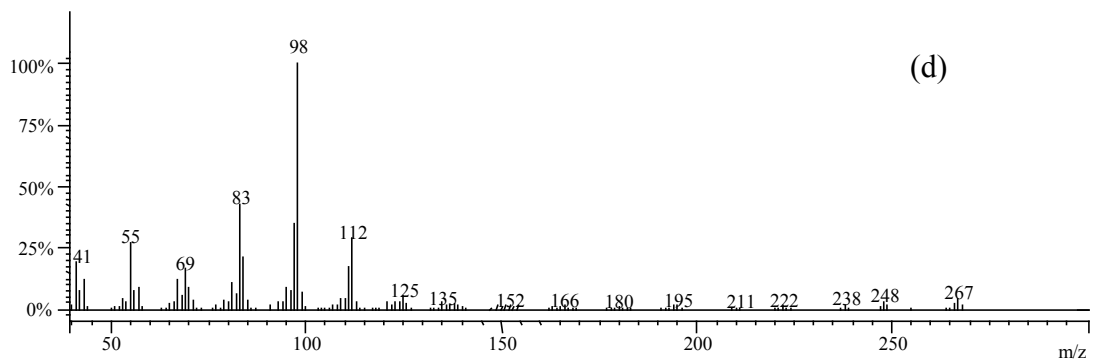
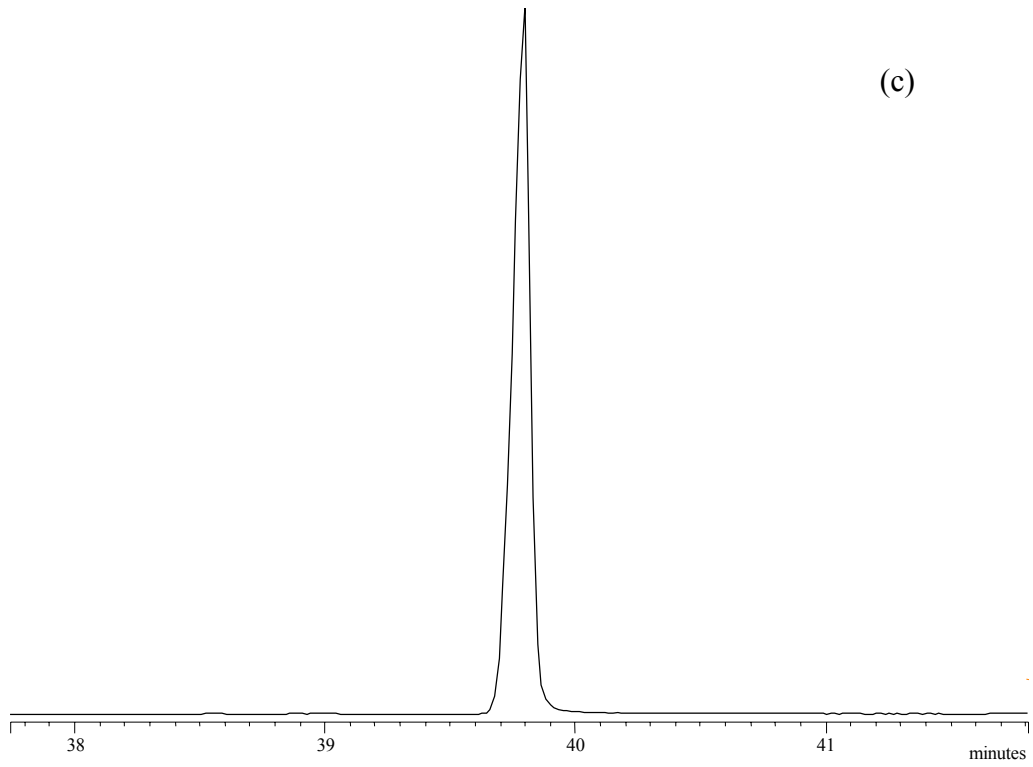
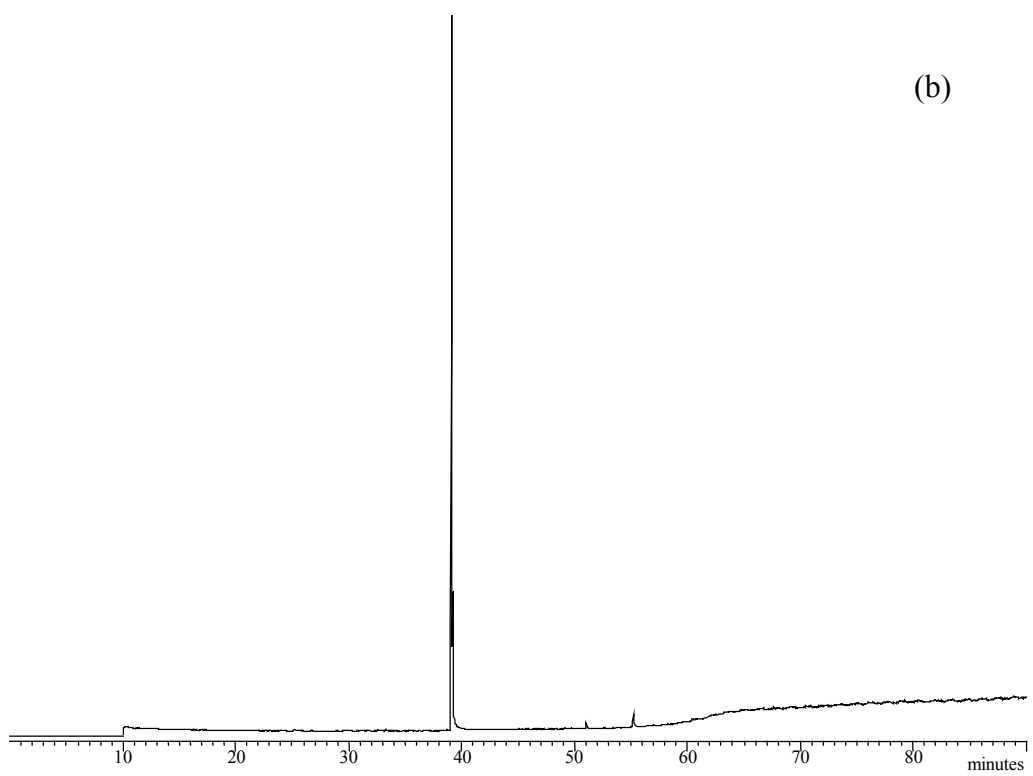
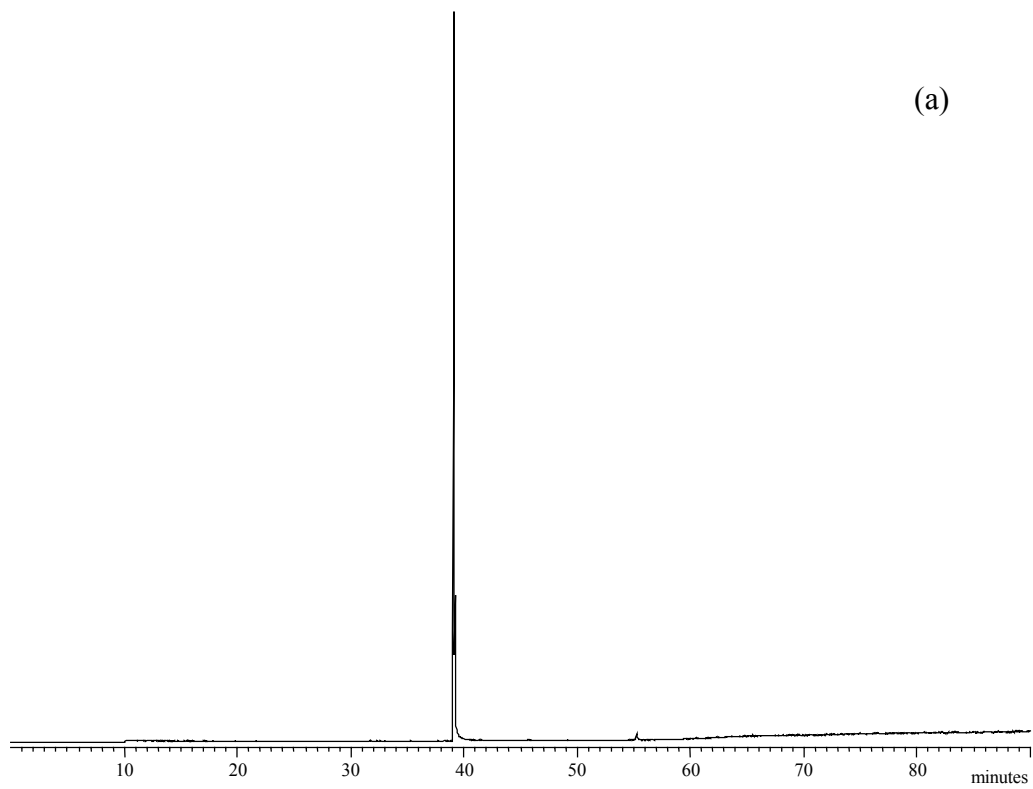


Abb. 10: *Chromatogramm [Ion $m/z=98$ (a), Totalionenstrom TIC (b und c)] des 2-Tetradecyl-cyclobutanons (2-tDCB) und dessen Massenspektrum (d).*



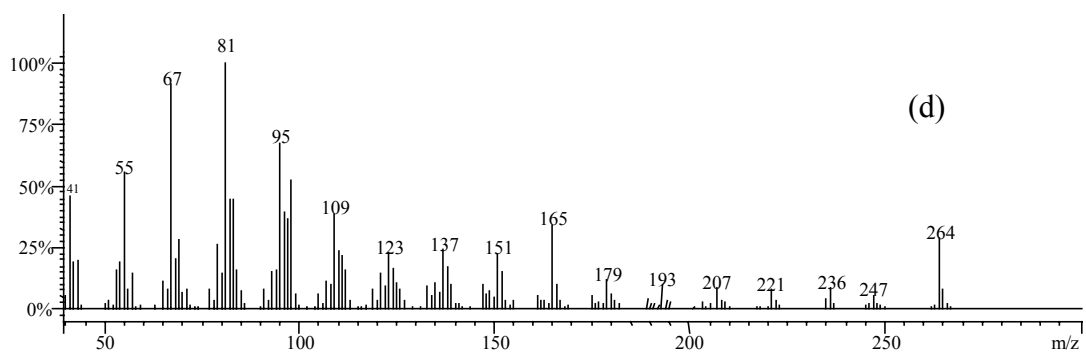
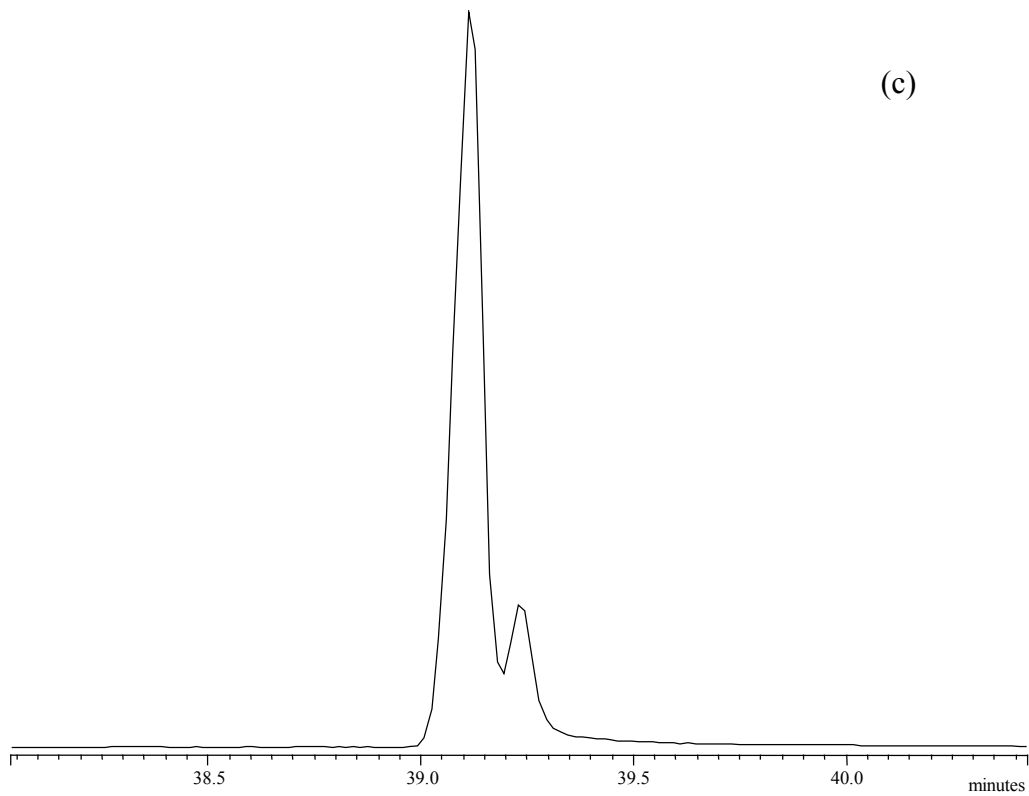
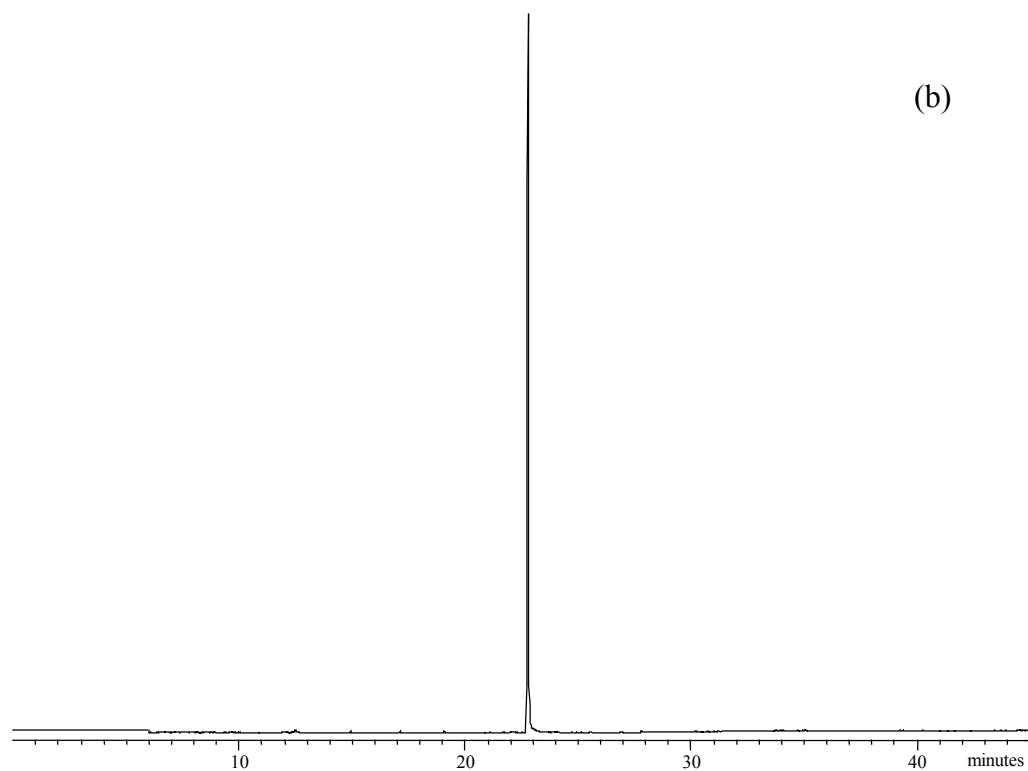
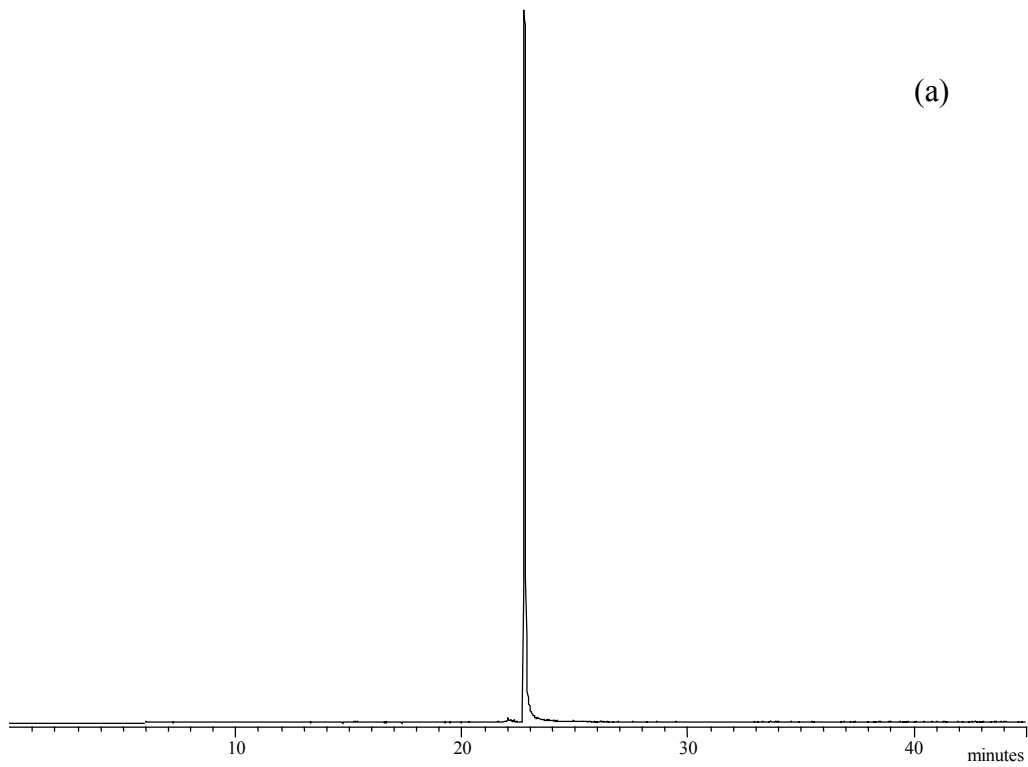


Abb. 11: *Chromatogramm [Ion $m/z=98$ (a), Totalionenstrom TIC (b und c)] des 2-Tetradecenyl-cyclobutanons (2-tDeCB) und dessen Massenspektrum (d).*



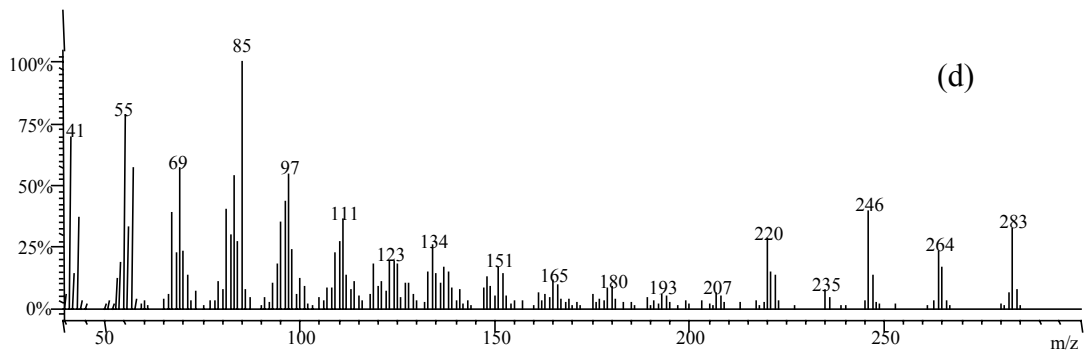
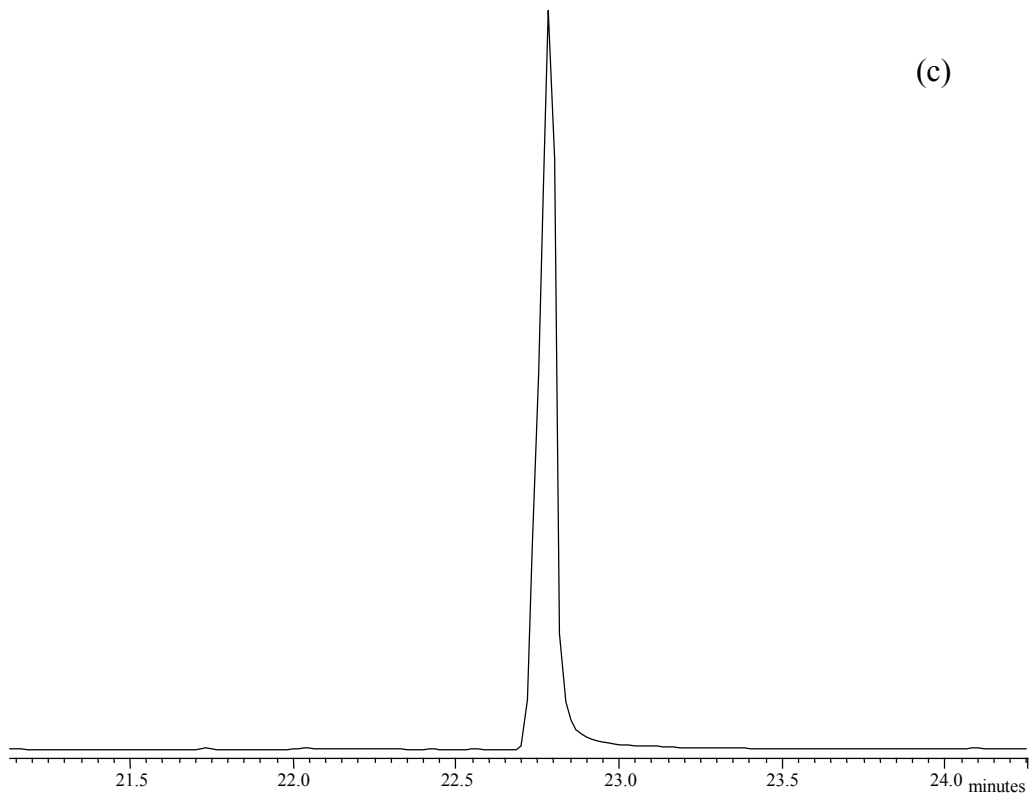


Abb. 12: *Chromatogramm [Ion $m/z=98$ (a), Totalionenstrom TIC (b und c)] des γ -Stearolactons und dessen Massenspektrum (d).*

2.5. BESTIMMUNG DES GEHALTES AN 2-ALKYLCYCLOBUTANONEN IN BESTRAHLTEN LEBENSMITTELN

Eric Marchioni⁽¹⁾, Péter Horvatovich⁽¹⁾ und Dalal Werner⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)

Université Louis Pasteur de Strasbourg

⁽²⁾ CRT Aérial

Im Rahmen dieses Projektes sind 13 verschiedene Lebensmittel untersucht worden, um die durch Bestrahlung gebildeten Mengen an 2-Alkylcyclobutanonen zu bestimmen. Die entsprechenden Berechnungen und Chromatogramme werden nachfolgend gezeigt.

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien

Die Standards der 2-Alkylcyclobutanone (2-Hexyl-, 2-Octyl-, 2-Decyl-, 2-Undecyl-, 2-Undecenyl-, 2-Dodecyl-, 2-Dodecenyl, 2-Tetradecyl- und 2-Tetradecenylcyclobutanon) und das 1,7-Hexadecadien (C16 :2) wurden im Labor für synthetische organische Chemie (UMR 7509) synthetisiert. Die Fettsäuremethylester- und Triglycerid-Standards wurden von Sigma (Saint-Quentin, France) bezogen. 2-Cyclohexylcyclohexanon kam von Fluka (Saint-Quentin, France). Florisil, mesh 60 – 100 / PR für die Pestizid-Analytik (Aldrich, Saint-Quentin, France), wurde mindestens 5 Stunden auf 550°C erhitzt und nach Abkühlung durch Zugabe von 20 Teilen dest. Wasser zu 100 Teilen Florisil (m / m) deaktiviert. Silicagel, 70 - 230 mesh (Merck, Darmstadt) wurde über Nacht auf 100°C erhitzt und nach Abkühlung durch Zugabe von 4 ml ultrareinem Wasser (Milli Q+, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) zu 100 g Silicagel deaktiviert. Natriumsulfat (SDS products, Peypin, France) wurde bei 650°C (5 h) geglüht und im Exsiccator abgekühlt. *n*-Hexan (techn.) wurde über Calciumhydrid destilliert. *tert*-Butylmethylether (TBME) kam von Merck (Darmstadt). Hydromatrix (Varian, Palo Alto, California, USA) wurde durch 6 h Soxhlet-Extraction mit *n*-Hexan gereinigt. Kohlendioxid, Reinheit 99,9999 %, mit 142 bar Helium Headspace, wurde von Air Product and Chemicals (Allentown, Pennsylvania, USA) bezogen. Alle sonstigen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren analysenrein.

Probenvorbereitung

13 Lebensmittel sind untersucht worden: 1 Milchprodukt (Trockenmilch), 3 pflanzliche Produkte (Haselnüsse, Avocados, Kakaobohnen), 4 Fleischprodukte (Hähnchen, Rinderfilet, Froschschenkel, Hamburger), 2 Fischprodukte (Lachs, Räucherlachs), 1 Eiprodukt (flüssiges Vollei) und 2 Zubereitungen (Gänseleberpastete, Hühnerklößchen, hergestellt von der französischen Lebensmittelindustrie). Alle diese Lebensmittel (außer Hühnerklößchen und flüssiges Vollei) wurden in regionalen Supermärkten gekauft. Diese Lebensmittel wurden ausgewählt, da bei ihrer Herstellung manchmal hygienische Probleme auftreten, die durch eine ionisierende Bestrahlung (Insektenbekämpfung, Eliminierung der pathogenen Mikroflora) erfolgreich behoben werden können. Die Hühnerklößchen wurden mit einer sehr hohen Strahlendosis behandelt, um sie vollends zu sterilisieren, damit sie bei Zimmertemperatur für längere Zeit gelagert werden konnten. Solche sterilisierten Lebensmittel werden für immundefiziente Patienten, sowie auch für Militär, Raumfahrt und Expeditionen, hergestellt.

Von jedem dieser Lebensmittel wurden 5 Proben (je etwa 200 g) in Gegenwart von Luft in Plastikbeuteln eingeschweißt und vor der Bestrahlung bei -20°C gelagert.

Für die Bestrahlung wurde ein Van de Graaff Elektronenbeschleuniger, 2,2 MeV, 75 μ A (Vivirad High Voltage, Handschuheim, France) im "Regional Centre of Innovation and Technology Transfer AERIAL" (Schiltigheim, France) eingesetzt. Verabreichte Strahlendosen (1, 3, 5, 10, 30 und 100 kGy) wurden mit FWT 60.00 Dosimeter (Far West Technology, Goleta, California, USA), zuvor kalibriert mit einem Alanidosimeter (Laboratoire National Henri Becquerel, Gif-sur-Yvette, France), überprüft. Eine gleichmässige Dosisverteilung von etwa $\pm 10\%$ innerhalb der Probe wurde durch die Anwendung einer 100 μ m dicken Kupferfolie erzielt (Kuntz *et al.*, 1991). Die Temperatur während der Bestrahlung betrug 6 - 8°C. Ausnahme waren die Hühnerklößchen, die bei - 80°C (in einer Mischung von Trockeneis und Ethanol) bestrahlt wurden. Die Niedertemperaturbestrahlung ist bei sehr hohen Strahlendosen erforderlich, um die sensorische Qualität zu erhalten.

Eine weitere Ausnahme waren die Froschschenkel, die in Frankreich bereits bestrahlt auf dem Markt sind. Froschschenkel werden vorsorglich mit etwa 5 kGy bestrahlt um eventuell vorhandene Salmonellen zu eliminieren. Die gekauften Proben waren alle durch den Zusatz auf der Packung "traités par les rayonnements ionisants" gekennzeichnet.

Um die Anfangsdosis der bestrahlten Froschschenkel zu bestimmen, wurde eine ESR Spektroskopie nach der Standardmethode EN 1786 durchgeführt. Hierzu wurde das ESR Signal in den getrockneten Knochen bestimmt. Danach wurde die Knochenprobe additiv mit 3, 5 und 10 kGy bestrahlt und das ESR Signal erneut bestimmt (Abb. 13 a). Die strahleninduzierten ESR Signale in den Knochen steigen linear proportional mit der angewandten Strahlendosis an (Abb. 13 b).

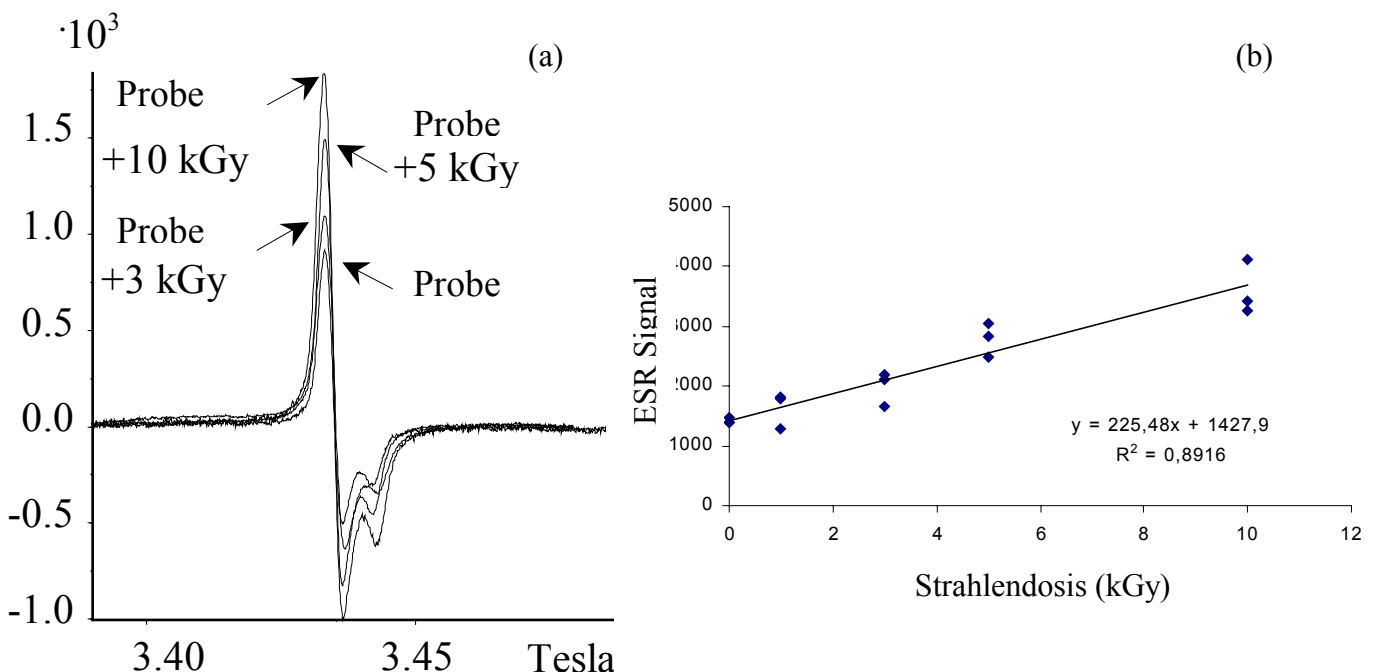


Abb. 13: ESR Signale (a) in bestrahlten Froschschenkelknochen (zusätzlich mit 0, 3, 5 und 10 kGy bestrahlt) und eine lineare Regression (b) um die ursprüngliche Dosis der Froschschenkel zu bestimmen.

Durch dieses Verfahren wurde die Anfangsdosis der bereits bestrahlten Froschschenkel auf etwa 6,3 kGy bestimmt. Die gesamten Froschschenkel wurden zusätzlich noch mit 5 und 10 kGy bestrahlt.

Fettextraktion und Reinigung

Die Extraktion der Fette aus den Lebensmitteln mit Hexan und die Bestimmung des Fettgehaltes, sowie die Analyse der 2-Alkylcyclobutanone wurden in Übereinstimmung mit dem CEN Standard (Anon., 1996) durchgeführt, allerdings mit dem Unterschied, dass vor der Florisil-Chromatographie 200 µl einer Mischung von 2-Undecyl- und 2-Undecenylcyclobutanon ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) auf die 200 mg Fettprobe zudotiert wurde. Die Analysen wurden dreifach wiederholt. Bei 2 der Lebensmittelproben (Avocados und flüssiges Vollei) wurde die Extraktion mit superkritischem Kohlendioxid durchgeführt (Horvatovich *et al.*, 2000).

Gaschromatographie der Fettsäuremethylester

Fettsäuremethylester wurden nach dem ISO Standardverfahren (Anon., 1978) präpariert. Sie wurden mittels eines Gaschromatographen (Varian 3300, Sunnyvale, USA) mit einer FFAP Kapillarsäule [25 m x 0,20 mm, i.d., 0,33 µm stationären Phase (Hewlett-Packard (HP), Geneva, Switzerland)], ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (250°C), analysiert. Trennbedingungen: Injektor 230°C, Temperaturprogramm 70°C (2 min), Heizrate 15°C / min auf 230°C, Endtemperatur gehalten für 10 Minuten, Injektionsvolumen 1 µl, Injektionsmodus splitlos, Trägergas N₂, 1 ml/min⁻¹.

Gaschromatographie und Massenspektrometrie der 2-Alkylcyclobutanone

Die Auftrennung der 2-Alkylcyclobutanone wurde mittels eines Varian Gaschromatographen (Typ 3400) mit einem SPI gekühlten Injektor und einem massenselektiven Detektor (Saturn 2000, Varian) mit Elektronenstoßionisation durchgeführt. Die Massenspektren wurden zwischen 50 und 300 m/z aufgenommen. Der Gaschromatograph war bestückt mit einem ZB-5-MS Kapillarsäule (Zebron, Torrance, California, USA), 30 m x 0,25 mm i.d. mit einer 0,10 µm stationären Phase (5 % Diphenyl- 95 % Dimethylpolysiloxan) oder mit einer OV-20-MS Kapillarsäule (Ohio Valley, Marietta, Ohio, USA), 60 m x 0,25 mm i.d. mit einer 0,10 µm stationären Phase (20 % Diphenyl-80 % Dimethylpolysiloxan). Bei Anwendung der ZB-5- MS Kapillarsäule wurden die Extrakte zuvor mit Hilfe eines silber-imprägnierten Kationen-Austauschers gereinigt (Ndiaye *et al.*, 1999a). Dabei wurde 1,7-Hexadecadien als interner Standard eingesetzt. Die Anfangstemperatur des Injektors war 50°C, 0,1 min, gefolgt durch 230°C / min auf 240°C, Endtemperatur bis zum Schluß des Säulentemperaturprogramms gehalten. Das Ofentemperaturprogramm der Säule war: Anfangstemperatur 60°C, 2 min, Heizrate 8°C / min oder 4°C / min für jeweils ZB-5-MS oder OV-20-MS, auf 300°C, Endtemperatur gehalten für 15 min. Injektionsvolumen 1 µl, Trägergas Helium (99,9995 % Reinheit, Air Liquide), 1 ml/min.

Die 2-Alkylcyclobutanone wurden im Einzelionenmodus über die Ionen der Massenzahl (m / z) 98 (2-Hexyl-, 2-Octyl-, 2-Decyl-, 2-Undecyl-, 2-Dodecyl- und 2-Tetradecylcyclobutanon) oder m/z 98+95 (2-Dodecenyl- und 2-Tetradecenylcyclobutanon) detektiert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Während dieser Untersuchungen konnten keine der gesuchten 2-Alkylcyclobutanone [2-Hexylcyclobutanon (2-HCB), 2-Octylcyclobutanon (2-OCB), 2-Decylcyclobutanon (2-DCB), 2-Dodecylcyclobutanon (2-dDCB), 2-Dodecylcyclobutanon (2-dDeCB), 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB) und 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDeCB)] in unbestrahlten Lebensmitteln gefunden werden. Diese Ergebnisse scheinen damit die Hypothese von Crone *et al.* (1992a, 1993) zu bestätigen, dass 2-Alkylcyclobutanone URP-Charakter (Unique Radiolytic Products) aufweisen. Vorsichtig ausgedrückt, liegen möglicherweise die 2-Alkylcyclobutanone in unbestrahlten Lebensmitteln unter der Nachweisgrenze der analytischen Methode.

Das CEN-Verfahren (EN 1785) ist bisher für den Nachweis von 2-dDCB und 2-tDCB (Anon., 1996) validiert worden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass es auch für den Nachweis von 2-HCB, 2-OCB, 2-DCB, 2-dDeCB und 2-tDeCB (Abb. 14) eingesetzt werden kann. Die Wiederfindungsraten der einzelnen 2-Alkylcyclobutanone - in verschiedenen Lebensmitteln gemessen - betragen nahezu 100 % für 2-tDCB (97 – 98 %) und für 2-dDCB (95 - 97 %), während sie jedoch mit abnehmender Kohlenwasserstoffkette kleiner wurden (90 – 92 % für 2-DCB, 77 – 79 % für 2-OCB und 69 – 73 % für 2-HCB), wahrscheinlich bedingt durch die zunehmende Flüchtigkeit der Substanzen. Diese niedrigeren Wiederfindungsraten sind durch einen Korrekturfaktor bei der Berechnung der nachfolgenden Ergebnisse berücksichtigt worden. Es besteht eine lineare Dosisabhängigkeit (R^2 immer zwischen 0,87 und 0,99, nur mit der Ausnahme von 2-Decylcyclobutanon in bestrahltem Hähnchenfleisch). Diese lineare Dosisabhängigkeit wurde bereits von Crone *et al.* (1992) und Stevenson *et al.* (1993) in Bezug auf die Bildung von 2-dDCB in Hähnchenfleisch beschrieben und erlaubt damit, die Menge der verschiedenen 2-Alkylcyclobutanone zu bestimmen, die in jedem Nahrungsmittel durch Radiolyse ihrer Vorläufer-Fettsäuren gebildet werden.

Tabelle 2: Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen in $\mu\text{g/g}$ Fett/kGy in verschiedenen Lebensmitteln.

Lebensmittel	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB
Trockenmilch	0,112	0,393	0,338	0,021	0,250
Haselnüsse	–	0,132	0,043	–	1,357
Hähnchenfleisch	0,006	0,342	0,118	0,072	0,806
Rinderfilet	0,037	0,767	0,649	0,090	1,350
Gänseleberpastete	0,017	0,883	0,794	0,047	1,853
Kakaobohnen	–	1,243	3,353	–	0,233
Hamburger	0,026	0,409	0,355	0,031	0,501
Räucherlachs	0,048	1,181	0,060	0,052	0,167
Froschschenkel	0,021	0,175	0,086	–	0,039
Hühnerklößchen	0,009	0,159	0,267	0,007	0,173
Lachs	0,045	0,142	0,026	0,083	0,199
Avocado	–	0,740	–	–	0,444
Flüssiges Vollei	–	0,159	0,083	0,014	0,255

Da in den meisten Lebensmitteln Palmitin-, Stearin- und Ölsäure (und etwas weniger Palmitoleinsäure) die häufigsten Fettsäuren darstellen, werden durch Bestrahlung hauptsächlich 2-dDCB, 2-tDCB, 2-tDeCB (und 2-dDeCB) gebildet. Diese 2-Alkylcyclobutanone wären damit auch die wichtigsten Substanzen für eine toxikologische Betrachtung von bestrahlten Lebensmitteln. Die gefundenen Mengen dieser Komponenten in $\mu\text{g} / \text{g}$ Fett / kGy (Tabelle 2) sind in guter Übereinstimmung mit früher veröffentlichten Werten (Stevenson *et al.*, 1990, 1993, 1996; Boyd *et al.*, 1991; Crone *et al.*, 1992 a, b, 1993). Diese Autoren fanden für Hähnchenfleisch immer Werte zwischen 0,3 und 0,6 $\mu\text{g} / \text{g}$ Fett / kGy für die Bildung von

2-dDCB. Die Menge der einzelnen 2-Alkylcyclobutanone hängt damit nur von der Strahlendosis und der Menge an Vorläuferfettsäuren ab. Die geringen Mengen an 2-DCB sind wahrscheinlich bedingt durch die äußerst niedrige Menge von der Vorläuferfettsäure Myristinsäure in den untersuchten Lebensmitteln. Tabelle 3 zeigt die Gehalte der 2-Alkylcyclobutanone in nmol / mmol Vorläuferfettsäure / kGy. Diese Werte stimmen gut überein mit den früher beschriebenen (Ndiaye *et al.*, 1999b), bei denen für gesättigte 2-Alkylcyclobutanone immer Werte zwischen 1,0 und 1,6 nmol / mmol Vorläuferfettsäure / kGy gefunden wurden. Sie liegen etwas höher für Haselnüsse (2-dDCB und 2-tDCB), Milchpulver (2-tDCB) und Hähnchenfleisch (2-tDCB). Allgemein scheint die molare strahleninduzierte Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen weder abhängig zu sein vom einzelnen 2-Alkylcyclobutanon, noch vom einzelnen Lebensmittel.

Wenn die molare Bildung der 2-Alkylcyclobutanone (nmol 2-ACB / mmol Vorläuferfettsäure / kGy) Werte niedriger als 1 annimmt, könnte das auf die niedrigen Gehalte der Vorläuferfettsäuren zurückgeführt werden. So sind die Gehalte an Myristinsäure in fast allen untersuchten Lebensmitteln (mit Ausnahme von Lachs und Milchpulver), an Palmitinsäure in Hühnerklößchen und Räucherlachs, Palmitoleinsäure in Hamburger, Räucherlachs, Hühnerklößchen und flüssigem Vollei, an Ölsäure in Kakaobohnen, Räucherlachs, Froschschenkel und flüssigem Vollei, sehr niedrig. Durch die damit verbundene sehr geringe Ausbeute an 2-Alkylcyclobutanonen treten bei der Analyse doch größere Schwankungen bei der quantitativen Bestimmung auf.

Allerdings läßt sich die hohe Bildung von 2-tDCB in Hamburgern und von 2-dDCB und 2-tDCB in Kakaobohnen nicht erklären. Möglicherweise kann durch Zumischung von Fremdfett (15 %, m:m) zu den Hamburgern, bzw. der Gehalt an starken Antioxidantien (Polyphenole) in Kakaobohnen die Abweichungen zu den anderen hier untersuchten Lebensmitteln begründet werden. Bereits Stevenson (1994) hatte eine bevorzugte Bildung von 2-tDCB im Vergleich zu 2-dDCB in bestrahltem Schweinefleisch beobachtet. Dies könnte möglicherweise mit der Position der Fettsäuren im Triglyceridmolekül erklärt werden. Die Positionen 1 und 3 bei der Esterbildung an Glycerin könnten bei einer Bestrahlung zu einer bevorzugten Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen beitragen. Folglich könnte die Verteilung der Fettsäuren im Triglyceridmolekül die Mengen der 2-Alkylcyclobutanone beeinflussen.

Tabelle 3: *Bildung von 2-Alkylcyclobutanonen in nmol / mmol Vorläuferfettsäure / kGy in verschiedenen Lebensmitteln.*

<i>Lebensmittel</i>	2-DCB	2-dDCB	2-tDCB	2-dDeCB	2-tDeCB
Trockenmilch	1,31	1,65	2,79	1,34	1,16
Haselnüsse	–	2,44	2,74	–	1,80
Hähnchenfleisch	–	1,88	2,32	1,41	1,65
Rinderfilet	0,70	1,33	1,67	1,09	1,59
Gänseleberpastete	–	1,39	1,93	–	1,08
Kakaobohnen	–	6,14	12,21	–	0,71
Hamburger	0,43	1,87	4,18	0,48	1,17
Räucherlachs	0,63	0,76	1,11	0,48	0,56
Froschschenkel	–	1,05	1,23	–	0,20
Hühnerklößchen	0,34	0,71	1,42	0,31	0,52
Lachs	1,03	1,30	1,20	1,31	1,21
Avocado	–	1,70	–	–	1,00
Flüssiges Vollei	–	1,20	1,80	0,60	0,70

Die Chromatogramme der bestrahlten Proben sind in den Abbildungen 14 - 26 dargestellt.

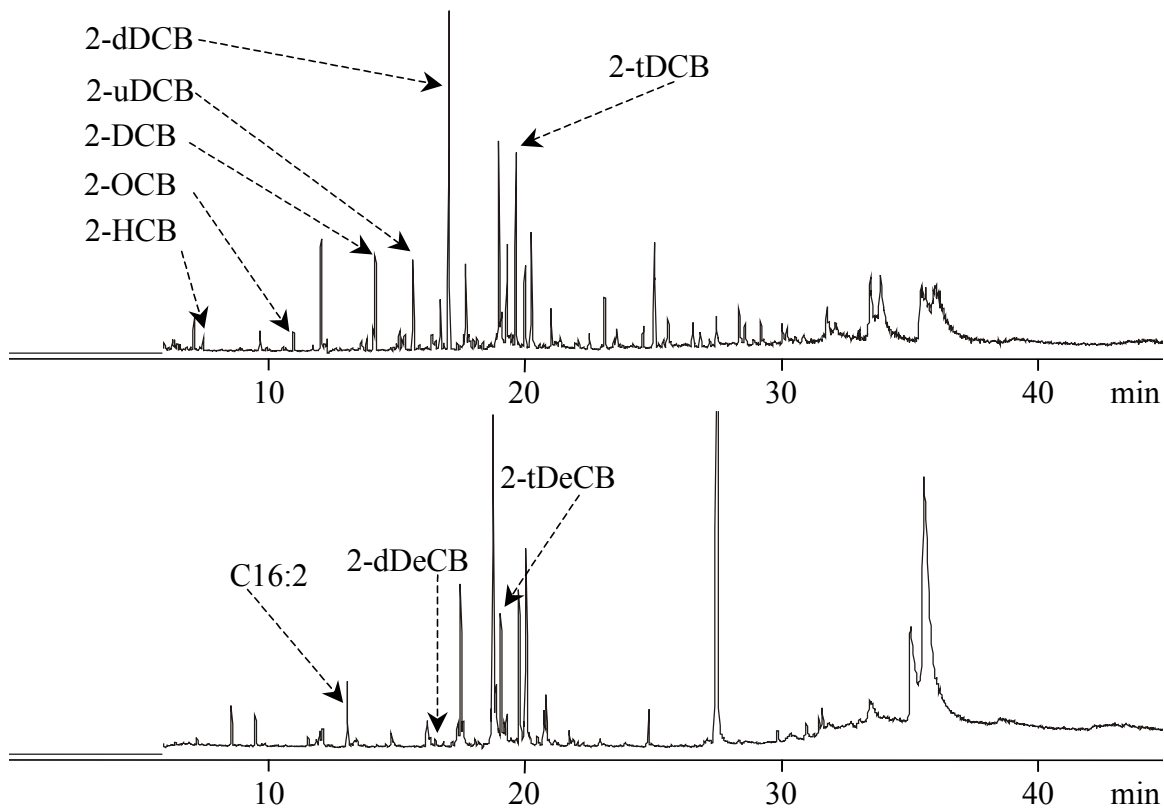


Abb. 14: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem Milchpulver (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

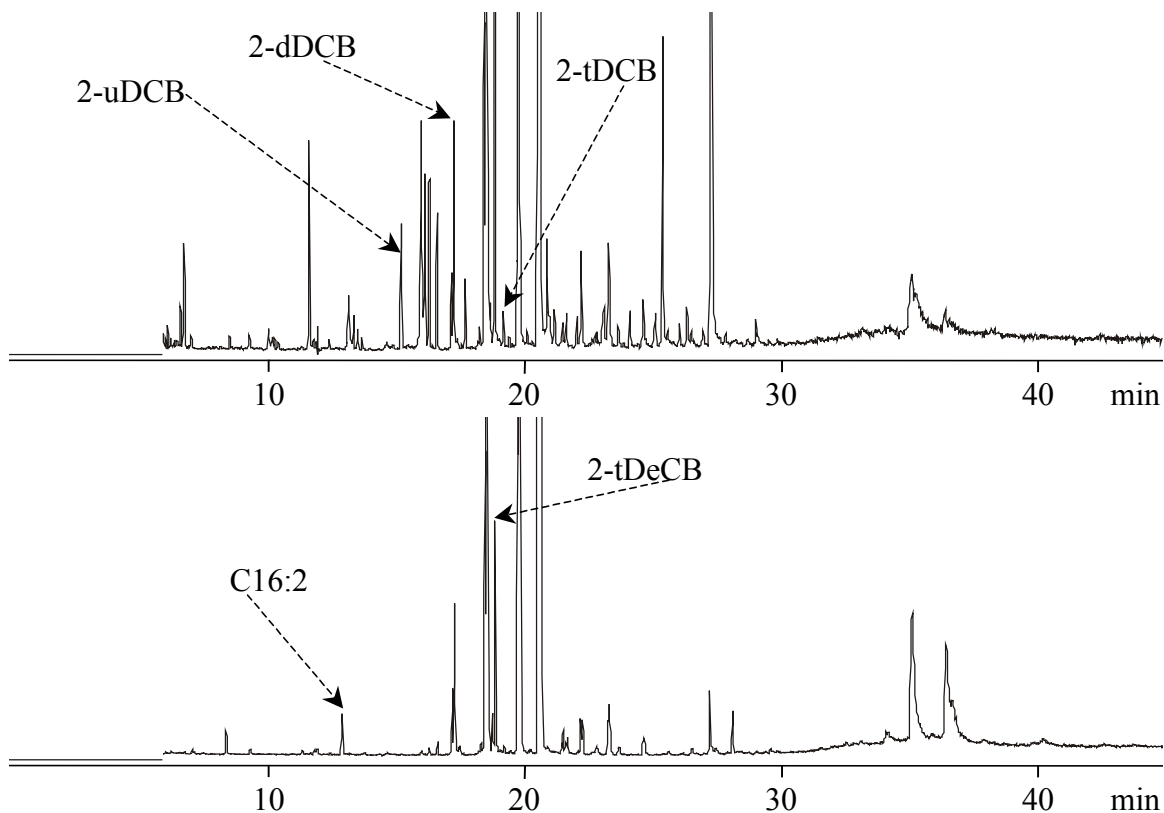


Abb. 15: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahlten Haselnüssen (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

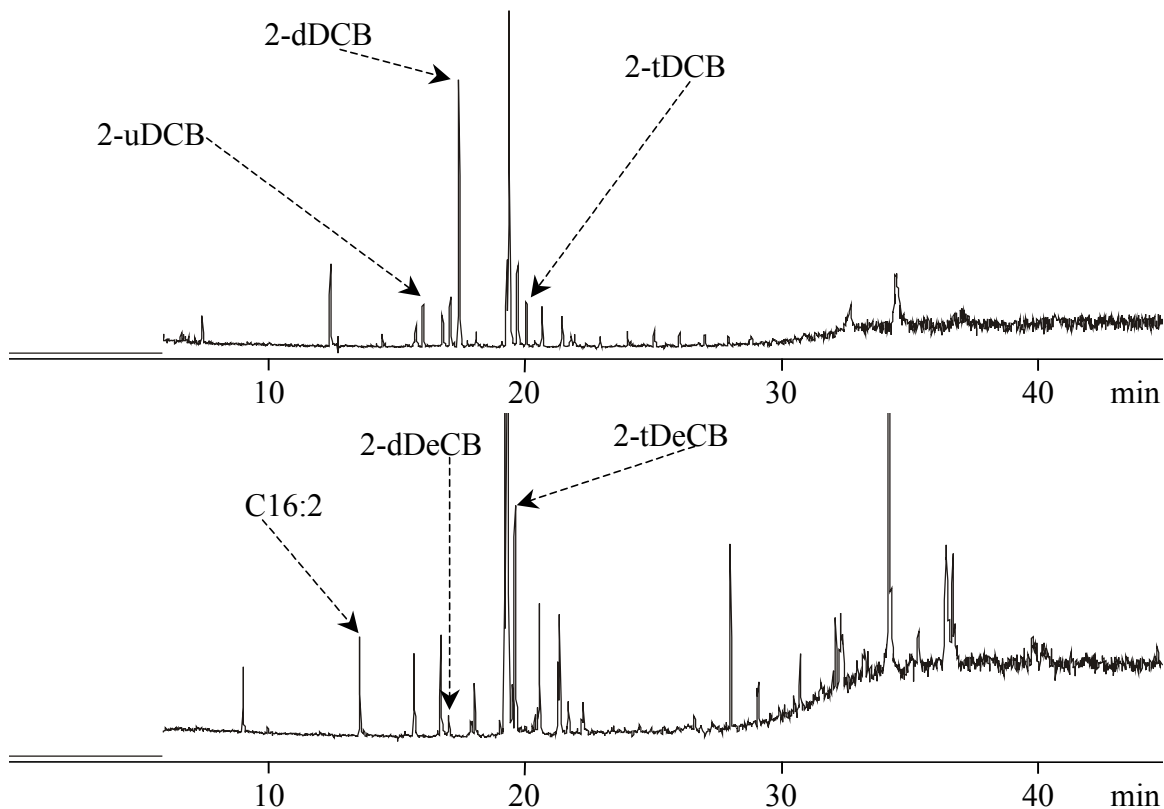


Abb. 16: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem Hähnchenfleisch (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

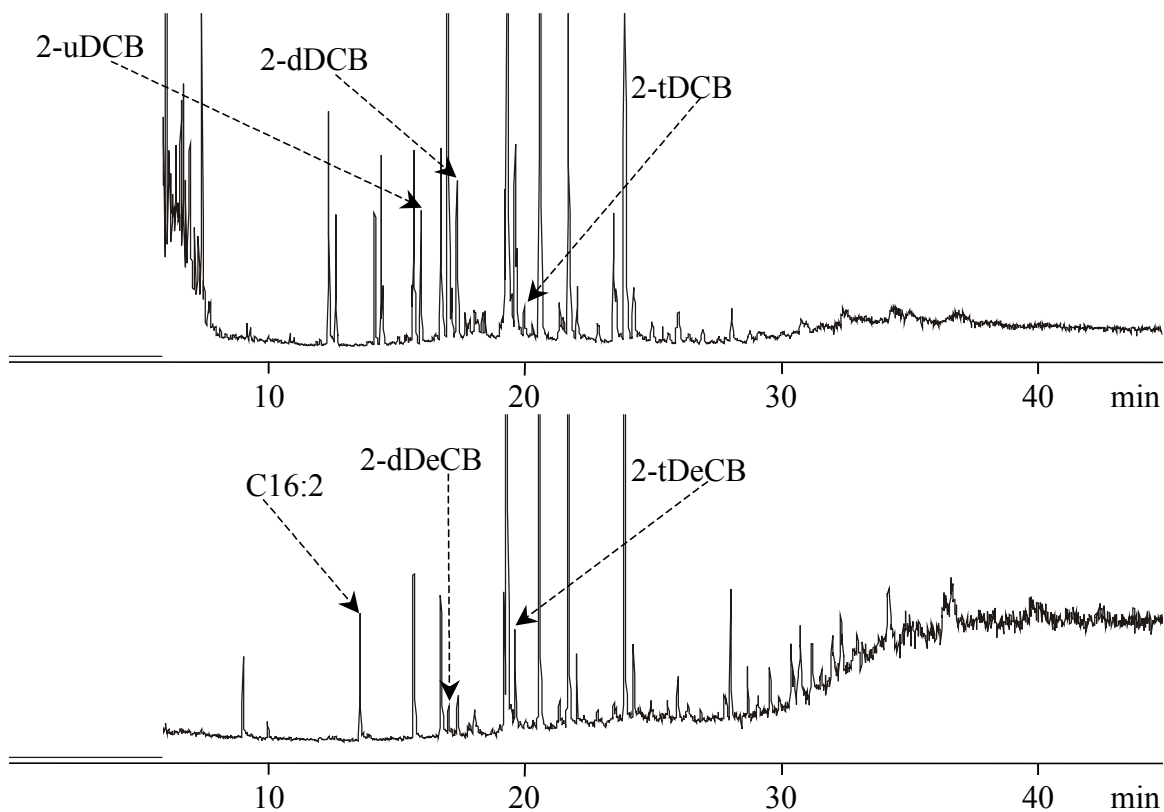


Abb. 17: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem Lachs (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

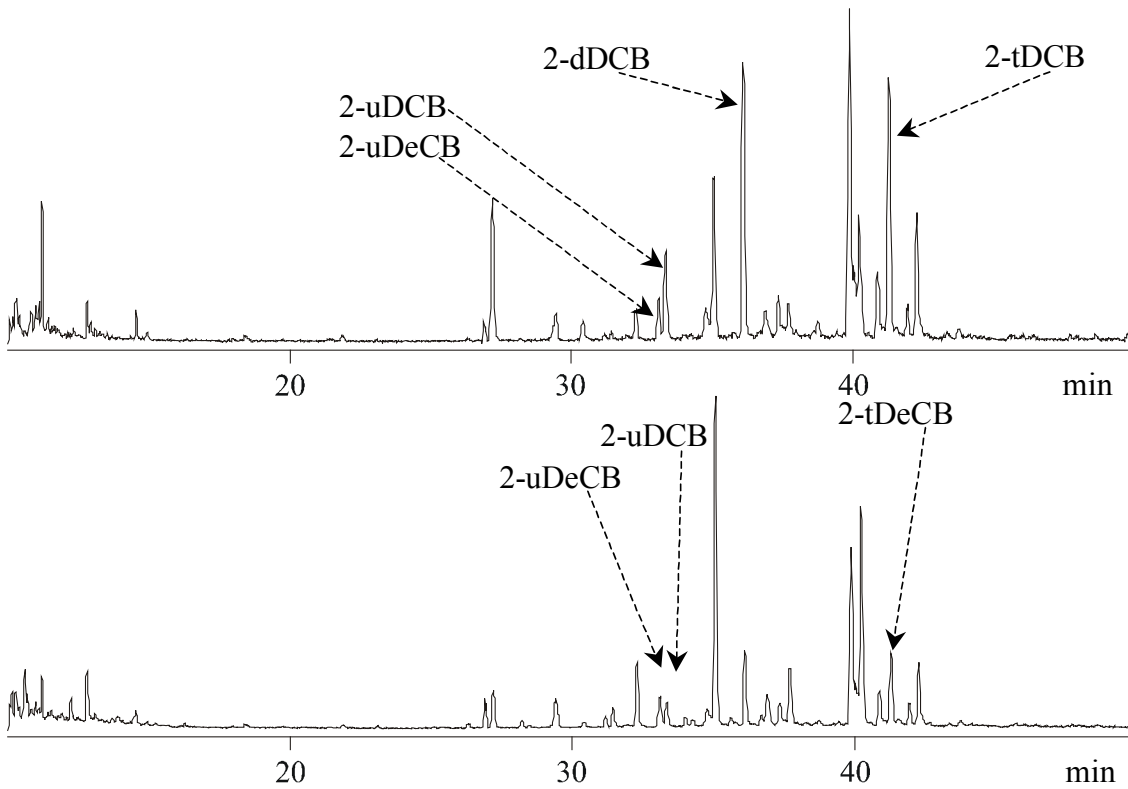


Abb. 18: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahlten Hamburger. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

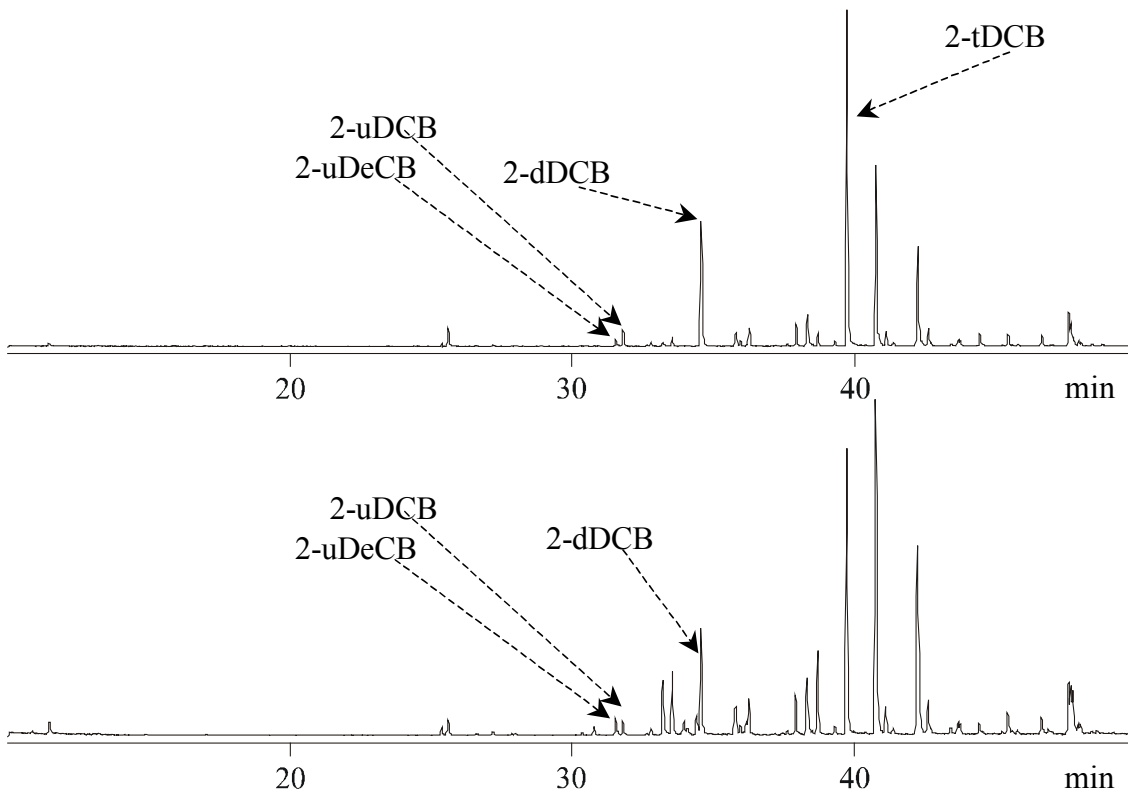


Abb. 19: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahlten Kakaobohnen. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

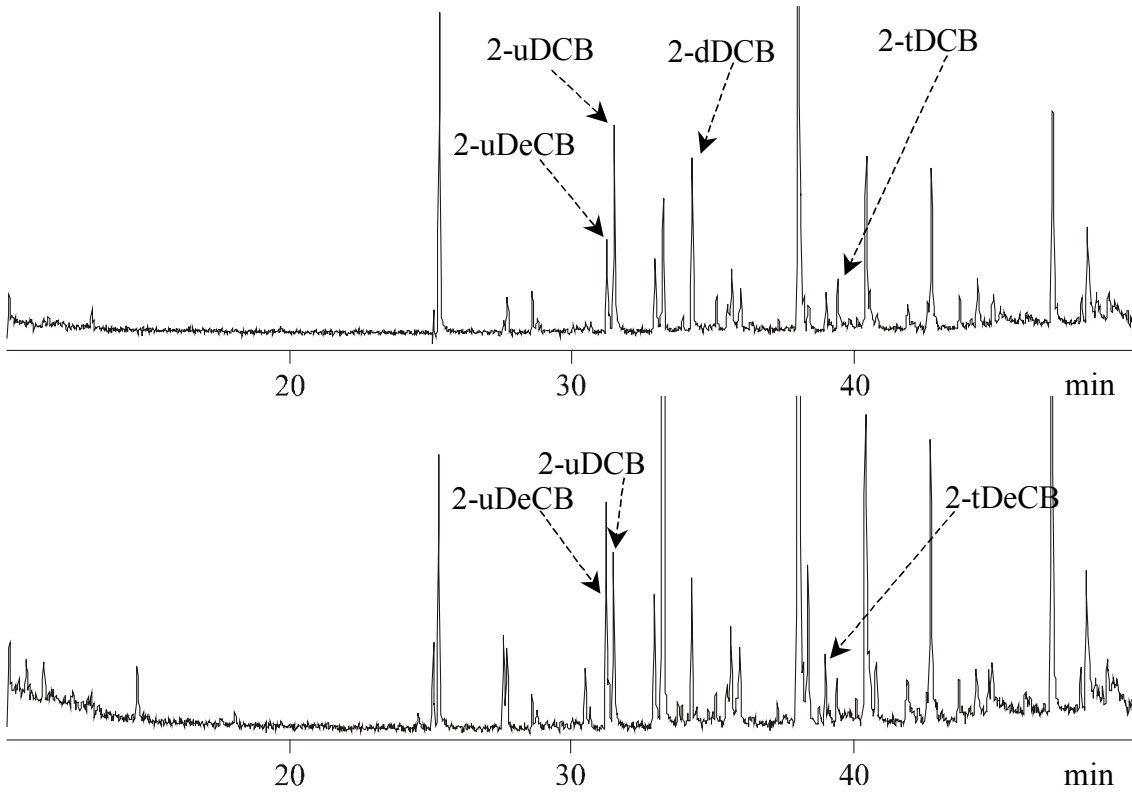


Abb. 20: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem Räucherlachs. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

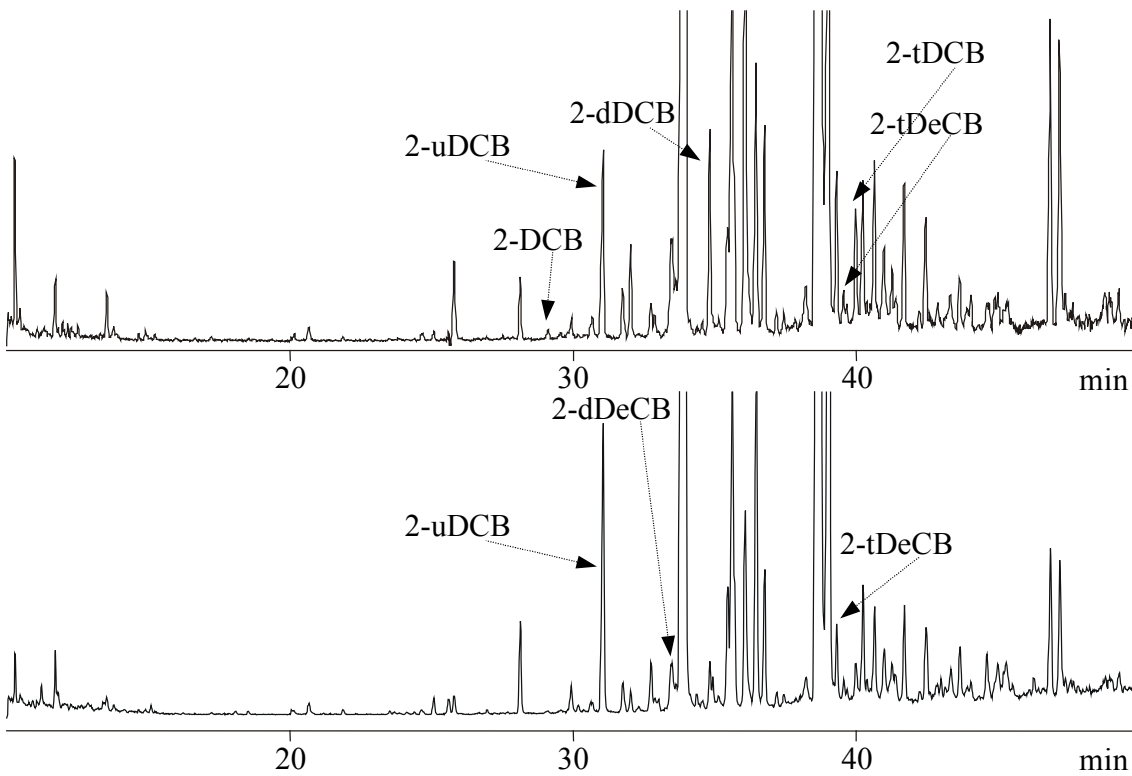


Abb. 21: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 6,3 kGy bestrahlten Froschschenkeln. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

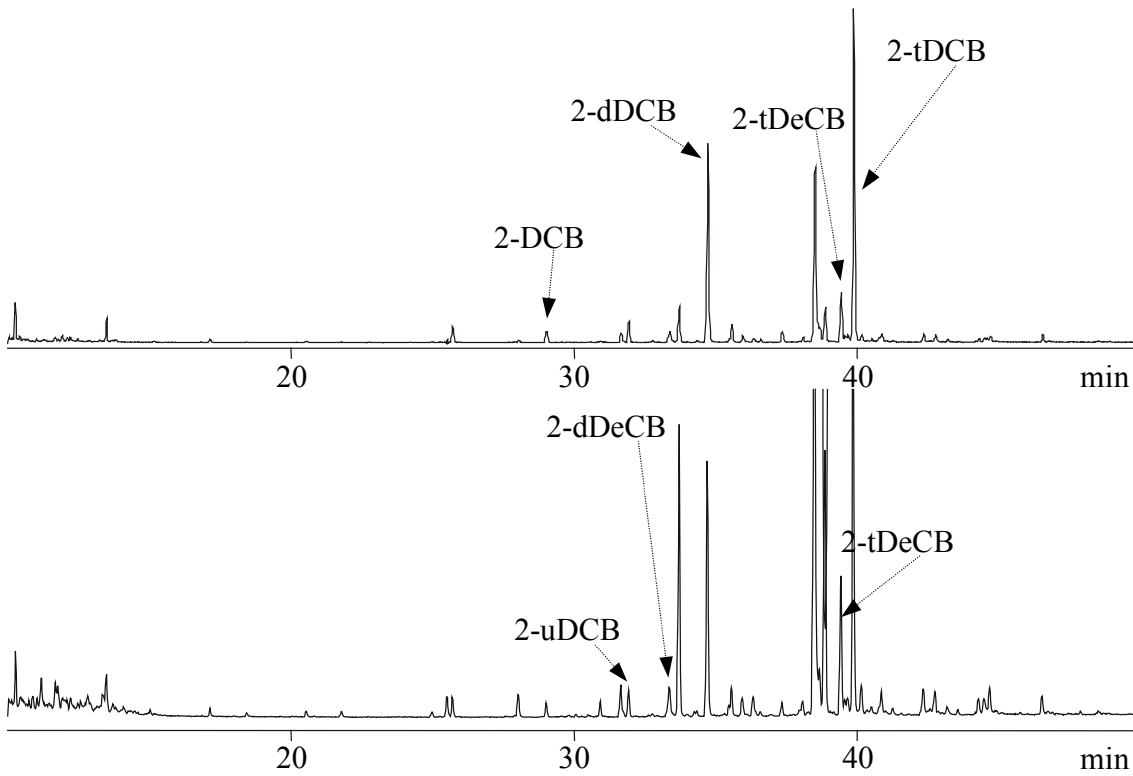


Abb. 22: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 50,0 kGy bestrahlten Hühnerklößchen. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

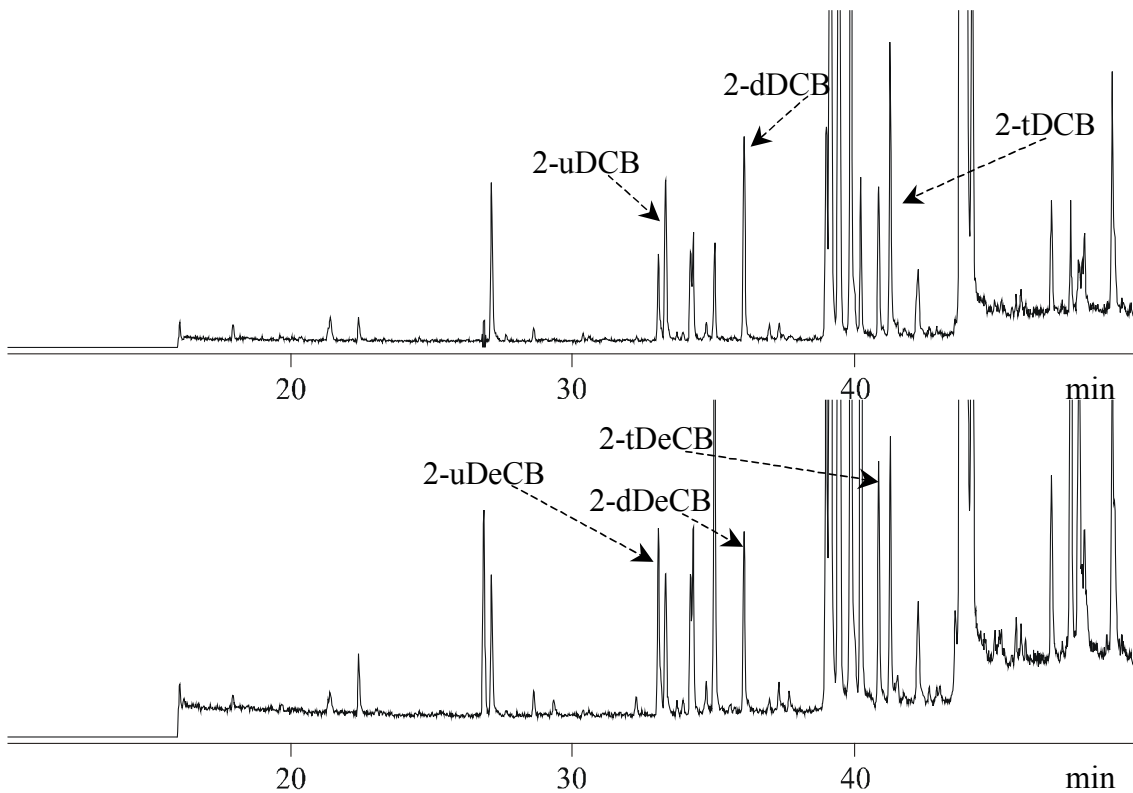


Abb. 23: Gaschromatogramm 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahlter Gänseleberpastete. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

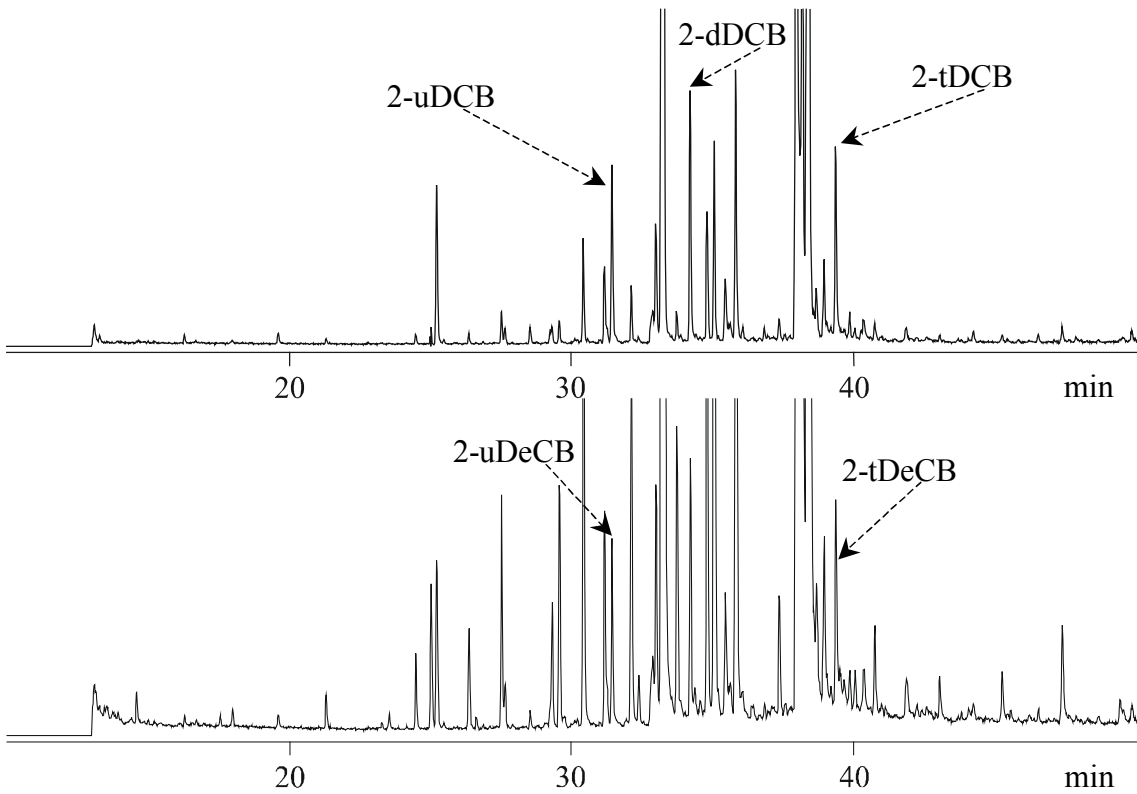


Abb. 24: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem Rinderfilet. Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

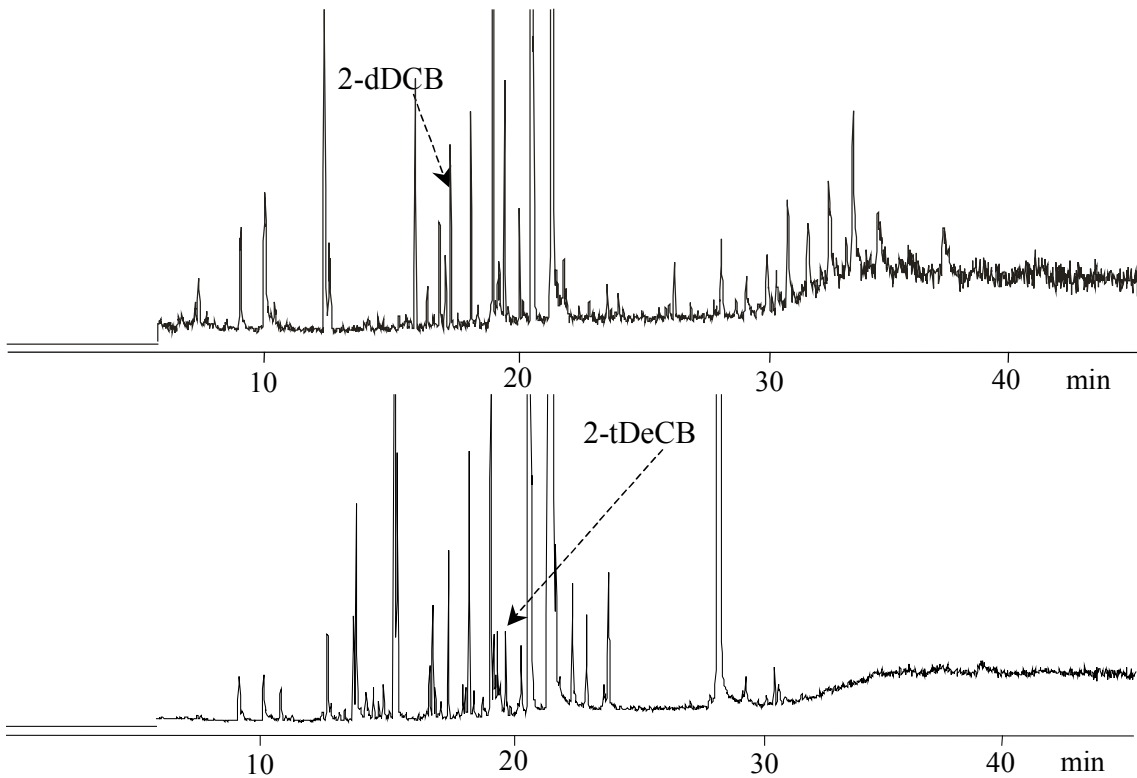


Abb. 25: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 1,0 kGy bestrahlten Avocados (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

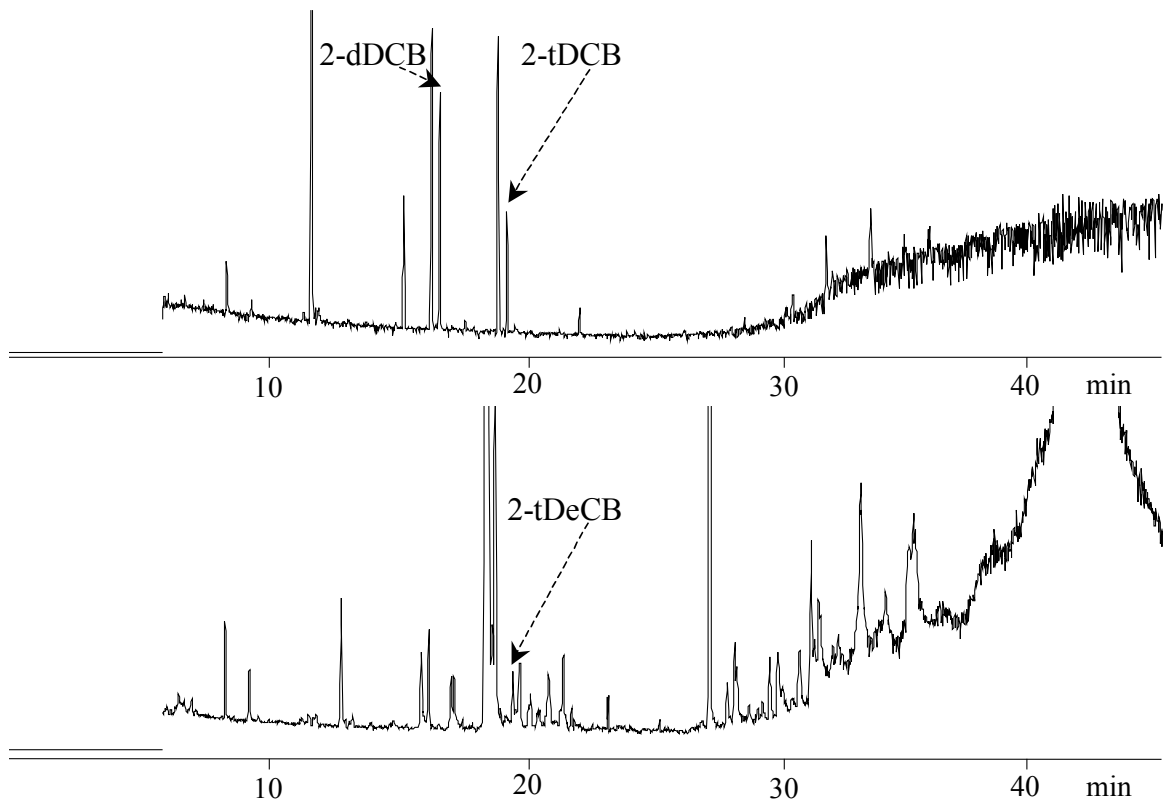


Abb. 26: Gaschromatogramm der 2-Alkylcyclobutanone in mit 5,0 kGy bestrahltem flüssigem Vollei (30 m ZB 5 Säule, Extrakte durch Argentations-Chromatographie gereinigt). Detektion der Ionen $m/z=98$ (gesättigte Komponenten) und $m/z=98+95$ (mono-ungesättigte Komponenten).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen über die Bildung von verschiedenen 2-Alkylcyclobutanonen in bestrahlten Lebensmitteln zeigen, dass in etwa 1,6 nmol 2-ACB / mmol Vorläuferfettsäure / kGy bei der Bestrahlung, unabhängig von der Fettsäure, entstehen. Diese Schlußfolgerung macht es möglich, die Mengen an durch Bestrahlung gebildeten 2-ACB vorherzusagen. So wird z.B. die Menge an 2-dDCB in Hähnchen in etwa

0,3 µg 2-dDCB in 1 g Hähnchenfett pro kGy betragen.

Angenommen der Fettgehalt in Hähnchen beträgt etwa 10 % und das Hähnchen würde mit einer Strahlendosis von 3 kGy (die obere Dosis für die Strahlenpasteurisierung von Hähnchen in den USA) behandelt, so würde die Menge an 2-dDCB betragen:

0,09 µg 2-dDCB in 1 g Hähnchenfleisch, bestrahlt mit 3 kGy.

Da das Hähnchen vor dem Verzehr erhitzt wird und nach Crone *et al.* (1992a) etwa 20 % Verlust bei der Zubereitung auftritt, beträgt die Menge etwa:

0,07 µg 2-dDCB in 1 g Hähnchenfleisch, bestrahlt mit 3 kGy

Da Palmitinsäure, aus der das 2-dDCB gebildet wird, nur 20 % der Gesamtfettsäuren in Hähnchenfleisch ausmacht, wird die Gesamtmenge an 2-ACB in etwa das 5-fache betragen:

0,4 µg 2-ACB in 1 g zubereitetem Hähnchenfleisch, bestrahlt mit 3 kGy

Beim Verzehr von 200 g Hähnchen (bestrahlt mit 3 kGy) würde der Konsument daher 80 µg 2-ACB aufnehmen. Bei einem Durchschnittskörpergewicht von 70 kg würde dies zu einer Aufnahme von etwa

1 µg 2-ACB / kg Körpergewicht führen.

Vorbehaltlich der Tatsache, dass Ergebnisse aus Tierversuchen nicht ohne weiteres auf Menschen übertragen werden können, ist es doch interessant, dies mit den Mengen an 2-Alkylcyclobutanonen, die bis jetzt in Tierversuchen getestet worden sind, zu vergleichen.

In zahlreichen Tierfütterungsversuchen, in denen bestrahlte Lebensmittel, die auch 2-Alkylcyclobutanone enthielten, verfüttert wurden, sind keine negativen Effekte beobachtet worden (WHO, 1999). In einer sehr großen solchen Studie (der sog. Raltech-Studie), sind 135 Tonnen Hühnerfleisch an Versuchstiere verfüttert worden. Die Bestrahlung entsprach einer Sterilisierung und die mittlere Strahlendosis betrug 58 kGy. Die Menge an bestrahltem Hühnerfleisch in der Tierdiät betrug 35 % (bezogen auf Trockengewicht). Auch in diesem Großversuch, unter Anwendung von hohen Strahlendosen, wurden keine negativen Effekte, einschließlich Mutagenität und Kanzerogenität, durch die Bestrahlung beobachtet (Thayer *et al.*, 1987).

Eine spätere Untersuchung zeigte, dass in der verfütterten Tierdiät, wie erwartet, 2-Alkylcyclobutanone enthalten waren, da noch nach 12 Jahren erhebliche Mengen an 2-Dodecylcyclobutanon in bestrahltem, gefrorenem und gelagertem Hühnerfleisch, aus obigem Versuch, gefunden wurden (Crone *et al.*, 1992b). Die Autoren fanden 10 µg 2-dDCB / g Fett in diesem Hühnerfleisch, was auf einen Lagerungsverlust von etwa 50 % im Laufe von 12 Jahren hindeutete. Da in der Tierdiät das Hühnerfleisch gefriergetrocknet war, haben die Autoren auch den Einfluß der Gefrietrocknung auf den 2-Alkylcyclobutanongehalt getestet. Unter ihren Bedingungen war der Verlust an 2-dDCB bei der Gefrietrocknung etwa 60 %.

Grob gerechnet, kann daher der Gehalt an 2-dDCB in der damaligen Tierdiät (Bestrahlungsdosis 58 kGy, 35 % Hühnerfleisch, bezogen auf Trockengewicht, mit einem Fettgehalt von 12 - 13 %, Erhalt bei der Gefrierdrying 40 %) auf

$$0,3 (\mu\text{g} / \text{g Fett} / \text{kGy}) \cdot 58 (\text{kGy}) \cdot 0,125 (\text{g Fett} / \text{g}) \cdot 0,35 \cdot 0,4 = 0,3 \mu\text{g} \text{ 2-dDCB} / \text{g Diät}$$

bestimmt werden (die genaue Menge an 2-Alkylcyclobutanonen, die an die Versuchstiere in der Raltech-Studie verfüttert wurde, ist im Nachhinein schwierig zu bestimmen, da sie von den Bedingungen bei der Gefrierdrying abhängt). Da der Gehalt an Palmitinsäure, aus der 2-dDCB gebildet wird, in Hühnerfleisch nur 20 % der Gesamtfettsäuren ausmacht, kann davon ausgegangen werden, dass die Gesamtmenge an 2-Alkylcyclobutanonen - wenn die molare Ausbeute aus anderen Fettsäuren ähnlich ist, was durch unsere Untersuchungen bestätigt wurde - in etwa das 5-fache beträgt. Die Gesamtmenge der 2-ACB wird daher auf 1,5 μg 2-ACB / g Diät geschätzt.

Bei den Langzeit-Fütterungsversuchen in der Raltech-Studie wurden auch Mäuse eingesetzt. Wenn wir annehmen, dass eine Maus mit einem Körpergewicht von etwa 30 g, pro Tag etwa 5 g Diät verzehrt, wird eine Aufnahme von etwa

$$250 \mu\text{g} \text{ 2-ACB} / \text{kg Körpergewicht} \quad \text{erreicht.}$$

Bei Ratten würde eine ähnliche Rechnung (tägliche Futteraufnahme 20 g, Körpergewicht 500 g) zu einer Aufnahme von etwa

$$60 \mu\text{g} \text{ 2-ACB} / \text{kg Körpergewicht} \quad \text{führen.}$$

Diese Überschlagsberechnungen zeigen, dass die Mengen an 2-Alkylcyclobutanonen, die in der Raltech-Studie verfüttert wurden, doch relativ hoch waren, im Vergleich zu der Menge, die ein Konsument durch Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln zu sich nehmen würde.

In unseren toxikologischen Untersuchungen sind die verabreichten Mengen an 2-ACB noch höher als in der Raltech-Studie. Üblicherweise werden toxikologische Studien ja mit erhöhten Konzentrationen der Testsubstanzen durchgeführt. Wenn toxische Effekte gefunden werden, kann ein Sicherheitsfaktor eingesetzt, bzw. bei genotoxischen / mutagenen Wirkungen muß eine Minimierung stattfinden und eine Sicherheitsbewertung durchgeführt werden.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau V. Zumsteeg, Frau M. Fischer und Frau S. Jung für ihre Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Anonym (1978) Corps gras d'origines animale et végétale - Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras. Norme ISO 5509 (Genève).

Anonym (1996a) Foodstuffs. Detection of irradiated food containing bones. Method by ESR spectroscopy. European Committee for Standardization (Brussels), EN 1786.

Anonym (1996b) Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

- Boyd, R. D., Crone, A. V. J., Hamilton, J. T. G., Hand, M. V., Stevenson, M. H., Stevenson, P. J. (1991) Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *J. Agr. Food Chem.*, **39**, 789-792.
- Crone, A. V. J., Hamilton, J. T. G., Stevenson, M. H. (1992a) Effect of storage and cooking on the dose response of 2-dodecylcyclobutanone, a potential marker for irradiated chicken. *J. Sci. Food Agr.*, **58**, 249-252.
- Crone, A. V. J., Hamilton, J. T. G., Stevenson, M. H. (1992b) Detection of 2-DCB in radiation sterilized chicken meat stored for several years. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **27**, 691-696.
- Crone, A. V. J., Hand, M. V., Hamilton, J. T. G., Sharma, N. D., Boyd, D. R., Stevenson, M. H., (1993) Synthesis, characterization and use of 2-tetradecylcyclobutanone together with other cyclobutanones as markers of irradiated liquid whole egg. *J. Sci. Food Agr.*, **62**, 361-367.
- Kuntz, F., Marchioni, E., Strasser, A. (1991) Homogénéisation de la dose déposée dans un produit ionisé aux électrons accélérés. In *Proceedings of an International Symposium on High Dose Dosimetry for Radiation Processing*, The International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria), 5-9 November 1990, Report IAEA SM 314/30, 479-488.
- Ndiaye, B., Horvatovich, P., Miesch, M., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999a) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. III. Improvement of the field of application on the EN 1785 method by using silver ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **858**, 109-115.
- Ndiaye, B., Jamet, G., Miesch, M., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999b). 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 437-445.
- Stevenson, M.H., Crone, A.V.J., Hamilton, J.T.G. (1990) Irradiation detection. *Nature*, **344**, 202-203.
- Stevenson, M.H., Crone, A.V.J., Hamilton, J.T.G., McMurray, C.H. (1993) The use of 2-dodecylcyclobutanone for the identification of irradiated chicken meat and eggs. *Radiat. Phys. Chem.*, **42**, 363.
- Stevenson, M.H. (1994) Identification of irradiated foods. *Food Technol.*, **48**, 141-144.
- Stevenson, M.H. (1996) Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial. In *Detection Methods for Irradiated Food - Current Status*, C.H. McMurray, E.M. Stewart, R. Gray and J. Pearce, eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 269-284.
- Thayer, D.W., Christopher, J.P., Campbell, L.A., Ronning, D.C., Dahlgren, R.R., Thomson, G.M., Wierbicki, E. (1987) Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken. *J. Food Prot.*, **50**, 278-288.

2.6 TOXIKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

2.6.1. Cytotoxizität und Genotoxizität von 2-Alkylcyclobutanonen in Human-Colontumor-Zell-Linien (HT 29 und HT 29 cl 19a)

Henry Delincée, Christiane Soika, Péter Horvatovich, Cornelia Hodapp und
Gerhard Rechkemmer

Institut für Ernährungsphysiologie, Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe

Ziel der Arbeit ist es, das toxikologische Potential der 2-Alkylcyclobutanone, die durch ionisierende Strahlen aus fetthaltigen Lebensmitteln gebildet werden, zu charakterisieren. Diese Substanzen enthalten die gleiche Anzahl (n) von Kohlenstoffatomen wie ihre Vorläuferfettsäuren, wobei an Ring-Position 2 des Cyclobutanons eine Kohlenwasserstoffkette mit n - 4 Kohlenstoffatomen befestigt ist. So wird aus Stearinsäure 2-Tetradecylcyclobutanon und aus Palmitinsäure 2-Dodecylcyclobutanon gebildet. Aus der ungesättigten Ölsäure wird das ungesättigte 2-(Tetradec-5'-enyl)-cyclobutanon gebildet, das sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Konfiguration vorkommen kann. Da die 2-Alkylcyclobutanone bis zum heutigen Zeitpunkt nur in bestrahlten und nicht in unbestrahlten Lebensmitteln gefunden worden sind, ist eine Charakterisierung ihres toxikologischen Potentials von Bedeutung. Bei früheren Untersuchungen (Delincée *et al.* 1998, 1999) mit 2-Dodecylcyclobutanon an Ratten-Dickdarmzellen (*in vitro* und *in vivo*) und an Colonzellen aus Human-Biopsien wurde mittels der Methode der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) eine DNA-Schädigung festgestellt. Leider liegen für die bei diesen Untersuchungen verwendete Testsubstanz keine Daten über Reinheit vor. Eine spätere Charakterisierung der Substanz (Reinheit, GC-MS Spektren, etc.) war nicht mehr möglich. Seither wurde eine neue Synthese der 2-Alkylcyclobutanone entwickelt und diese neuen Substanzen, die für die jetzigen Untersuchungen eingesetzt werden, sind im Vorfeld gut charakterisiert worden (Miesch *et al.* 1999, 2001).

Für die erweiterten Versuche mit mehreren 2-Alkylcyclobutanonen sollen als Zielzellen wieder Dickdarmzellen eingesetzt werden, ein Gewebe, in dem ernährungsbedingte Tumore entstehen können. Zunächst werden etablierte Colontumor-Zell-Linien, die üblicherweise als Modell für *in vitro* Arbeiten verwendet werden, eingesetzt. Am Institut für Ernährungsphysiologie stehen die Human-Colontumor-Zell-Linien HT 29 und der differenzierte Subclon HT 29 cl 19A zur Verfügung. Für beide Zell-Linien werden zunächst die Konzentrations- und Zeitabhängigkeiten der toxischen Wirkung erarbeitet. Danach wird die DNA-schädigende Wirkung mit Hilfe des Comet Assays untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Zellkultur

HT 29 Zellen haben ihren Ursprung aus einem Colon-Adenocarcinom einer 44-jährigen Frau; die Zell-Linie wurde 1964 durch Fogh (Sloan Kettering Institute for Cancer Research, Rye, NY, USA) etabliert (Fogh *et al.* 1977). Die Zell-Linie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (Drexler *et al.* 1997) erhalten. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum und 1 % (v/v) Penicillin (5000 U / ml) / Streptomycin (5000 µg / ml) bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in T₈₀-Zellkulturflaschen (Medium und Supplemente von LifeTechnologies, Karlsruhe).

Der Subclon HT 29 cl 19A wurde durch Behandlung von HT 29 Stammzellen mit Natriumbutyrat etabliert (Augeron und Laboisie, 1984). Die undifferenzierten HT 29 Zellen

bilden hierdurch neue Eigenschaften aus, z.B. haften sie stärker am Gefäßboden und bilden flache Foci. Der hieraus entwickelte HT 29 cl 19A Subclon zeigt polare Zellen mit einer apikalen und basolateralen Seite. Diese Zellen ermöglichen einen aktiven trans-epithelialen Transport von gelösten Substanzen. Die Anwendung von sowohl HT 29 Stammzellen als auch HT 29 cl 19A Zellen hat den Vorteil, dass Dickdarmzellen in verschiedenen Entwicklungsstufen auf ihre Reaktionen getestet werden. Die Kultivierung erfolgt wie bei den Stammzellen (Abrahamse und Rechkemmer 2001).

Trypsinierung

Die Zellen wurden in einer Zahl von $\sim 0,1 \times 10^5 / \text{cm}^2$ in T₈₀ - Zellkulturflaschen ausgesät, Mediumwechsel alle 2 Tage. Bei 80 - 100 % Konfluenz wurden, nach Entfernen des Mediums vom Zellrasen, die Zellen zweimal mit je 2 ml Phosphatpuffer (Dulbecco's PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, ohne Natriumbicarbonat, pH 7,0 - 7,2) gewaschen und dann mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g Trypsin; 0,2 g EDTA pro Liter modifizierte Puck's-Salzlösung [0,4 g / l KCl; 8,0 g / l NaCl; 0,35 g / l NaHCO₃]) für 3 - 5 Min. inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflaschen ablösten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 9 ml Komplett-Medium gestoppt und die Zellen in Polypropylen-Röhrchen (15 ml) überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 Min. bei 200 g), der Überstand abgesaugt, frisches Medium hinzugegeben, die Zellen resuspendiert und die Zellzahl durch Zählung in einer Neubauerkammer bestimmt. Alle Lösungen wurden bezogen von Life Technologies, Karlsruhe.

Testsubstanzen

2-Tetradecyl-cyclobutanon (2-tDCB), 2-(Tetradec-5'-enyl)-cyclobutanon (2-tDeCB), ein Gemisch bestehend aus etwa 85 % *cis*- und 15 % *trans*-2-tDeCB, reines *cis*- und *trans*-2-(Tetradec-5'-enyl)-cyclobutanon, 2-Dodecyl-cyclobutanon (2-dDCB) und ein mögliches Oxidationsprodukt des 2-tDCB, das γ -Stearolacton, wurden von unseren Projektpartnern an der Universität Louis Pasteur, Straßburg synthetisiert. Die Synthese, Charakterisierung und Reinheit (~ 95 – 97 %) der hergestellten 2-Alkylcyclobutanone ist von Miesch *et al.* (1999, 2001) beschrieben worden.

Lösen der Testsubstanzen

Durch die lange Kohlenwasserstoffkette an der Ring-Position 2 der Cyclobutanone ist die Löslichkeit unserer Testsubstanzen in wäßrigen Lösungen begrenzt. Als geeignetes Lösungsmittel stellte sich, nach Vorversuchen, absolutes Ethanol (EtOH) heraus. In 100 % Ethanol werden auch nach Lagerung über mehrere Tage die 2-Alkylcyclobutanone nicht verändert (Test durch M. Miesch).

Da unsere Zell-Linien HT 29 und HT 29 cl 19A nur begrenzt Ethanol tolerieren, wurde in Vorversuchen 2 % Ethanol als maximale Ethanol-Endkonzentration in Zelllösungen festgelegt. Bei höheren Ethanolkonzentrationen starben die Zellen ab. Beim Einsatz von 2-tDCB als Testsubstanz konnte deshalb nur eine Menge von 100 μg 2-tDCB/ml Zelllösung (entspricht in etwa 400 μM) in Lösung gebracht werden. Bei größeren Mengen präzipitierte das 2-tDCB. Als Testkonzentrationen wurden deshalb zunächst für 2-tDCB 400 μM , 200 μM , 100 μM , 50 μM und 25 μM gewählt. Diese Endkonzentrationen wurden dann auch für die anderen Testsubstanzen eingesetzt.

Bestimmung der Cytotoxizität

Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen in Mikrotiterplatten (24-wells und 96-wells) direkt inkubiert. Als Indikator einer Cytotoxizität wurde die Reduktion von Tetrazolium-Farbstoffen eingesetzt, die im allgemeinen auf die mitochondrialen Dehydrogenasen der vitalen Zellen zurückgeführt wird (Cook und Mitchell, 1989). Laut Berridge *et al.* (1996) können verschiedene Tetrazoliumsalze dazu beitragen, unterschiedliche Enzymaktivitäten anzuzeigen. So ist einerseits - im Fall von 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) - die Reduktion abhängig von den intrazellulären Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und den Mitochondrien, während andererseits - im Fall von 4-[3-(4-Iodophenyl)-2(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat (WST-1) - die extrazellulären Enzyme auf der Oberfläche der Plasmamembran mitverantwortlich sind. Beide Verfahren sind am Institut für Ernährungsphysiologie etabliert. (Die Tetrazoliumsalze MTT und WST-1 wurden von Sigma, München, bzw. Roche Molecular Biochemicals, Mannheim bezogen).

Die Bestimmung mit MTT (Mosmann, 1983; Green *et al.* 1984) wurde in 24-well-Mikrotiterplatten durchgeführt und die Reduktion von WST-1 (Ishiyama *et al.* 1995) in 96-well-Mikrotiterplatten. Bei der Reduktion der leicht gelblichen Tetrazolium-Salze werden intensiv gefärbte Formazane gebildet, die leicht im Spektralphotometer gemessen werden können. Die Farbstoffentwicklung ist proportional zur Anzahl vitaler, metabolisch aktiver Zellen im Ansatz.

Kurz beschrieben, wurden bei den Tests die Zellen in den Wells der Mikrotiterplatten ausgesät und 2 Tage kultiviert (37°C, 5 % CO₂, und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit); die Testsubstanzen wurden entweder gleich zu Anfang oder nach einem Tag, bzw. den letzten 30 Minuten mit inkubiert; nach Zugabe des Tetrazoliumsalzes wurde nach einer festgelegten Reaktionszeit die Farbstoffentwicklung gemessen (bei MTT nach Lyse der Zellen im Mikrotiter-Lesegerät Spectrafluor Plus (Tecan, Durham, NC, USA) bei 560 nm, Referenzwellenlänge 690 nm; bei WST-1 ohne Lyse im Mikrotiter-Lesegerät SoftMax (Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA, USA) bei 450 nm, Referenzwellenlänge 650 nm). Als Kontrolle ohne 2-Alkylcyclobutanon und ohne Ethanol als Lösungsmittel, diente reines Zellmedium. Als Lösungsmittel-Kontrolle wurde Ethanol in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Als Kontrolle ohne Zellen diente MTT- bzw. WST-1-Lösung im Medium. Die MTT-Messungen wurden doppelt bis dreifach, d.h. jeweils mit zwei 24-well Mikrotiterplatten mit je 2 - 3 Meßwerten pro Testkonzentration durchgeführt. Die Blindwerte (Medium) wurden pro Platte 5-fach gemessen, der Mittelwert gebildet und von dem Mittelwert der Meßwerte subtrahiert. Die WST-1-Reduktion (1 - 3 -fache Messung) wurde auf eine 96-well Mikrotiterplatte und 3 - 5 Meßwerten pro Testkonzentration gemessen. Blindwerte (Medium) wurden 3 - 5-fach gemessen, der Mittelwert gebildet und vom Mittelwert der Meßwerte subtrahiert. Die erhaltenen Meßwerte wurden durch Division mit dem Wert für die Lösungsmittelkontrolle (2 % Ethanol) normiert und stellen daher die Vitalitätsrate in % dar. Sowohl der MTT-Test als auch der WST-Test sind im Detail von Horvatovich (2001) beschrieben.

In einem weiteren Ansatz wurde für die Cytotoxizitätsbestimmung mit der Zugabe der Testsubstanzen gewartet bis die Zellen Konfluenz erreicht hatten, und dann für 0,5 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Der MTT-Test wurde in diesen Versuchen auch für 96-well Mikrotiterplatten modifiziert. Damit konnte Testsubstanz eingespart werden. Dieser Ansatz wurde zunächst nur für die HT 29 cl 19A Zellen durchgeführt.

Bestimmung der Genotoxizität

In den früheren Versuchen wurden primäre Ratten-Dickdarmzellen 30 Minuten mit 2-Dodecylcyclobutanon bei 37°C inkubiert (Delincée und Pool-Zobel 1998). Längere Inkubationszeiten der primären Ratten-Dickdarmzellen - ohne 2-Alkylcyclobutanon - führten zu einer deutlichen Verringerung der Vitalität dieser Zellen (Wollowski, 1998). Obwohl mit den Tumorzellen eine längere Inkubationszeit möglich ist, wurde zunächst, um den Vergleich mit den früheren Versuchen zu ermöglichen, ebenfalls eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C gewählt. Zu 1 ml Zell-Lösung in Falcon-Teströhrchen (14 ml, 17 x 100 mm) mit etwa 2×10^6 Zellen wurden 20 µl in Ethanol gelöste Testsubstanz gegeben und im Schüttelwasserbad (Lauda, CS 20, Schüttelfrequenz ~ 120 / Min.) bei 37°C inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde vor und nach dem Inkubieren mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests überprüft (Pool et al. 1990, Pool-Zobel et al. 1994).

DNA-Schäden an den Colontumorzellen wurden mit Hilfe des Comet Assays untersucht (Pool-Zobel *et al.* 1994, 1997, 1999), wobei die Elektrophorese in einer alkalischen Lösung (pH >13) durchgeführt wird (Rojas *et al.* 1999, Tice *et al.* 2000). Die Versuche wurden 2 - 3fach durchgeführt, jeweils mit zwei bis drei Objektträgern (50 Zellen pro Objektträger) pro Datenpunkt. Die Auswertung wurde am Fluoreszenzmikroskop mit dem Bildverarbeitungsprogramm "Colourmorph Release 5.0" bzw. "Comet Assay II Image Analysis" der Perceptive Instruments (Halstead, Großbritannien) vorgenommen. Die DNA-Verteilung in den Kometen wurde als % Fluoreszenz im Schweif dargestellt, die mit zunehmender Schädigung ansteigt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Cytotoxizität

Die Cytotoxizitätsmessungen mit MTT sind für die verschiedenen 2-Alkylcyclobutanone und das γ -Stearolacton für die HT 29 Stammzellen in Abbildung 27 zusammengefaßt. Nach nur 30 Minuten Einwirkungszeit ist eine Cytotoxizität, auch bei der höchsten Konzentration von etwa 400 µM, kaum ersichtlich. Allerdings zeigen längere Einwirkungszeiten (24 h und 48 h) mit zunehmender Konzentration (≥ 50 µM) eine deutliche Cytotoxizität. Die Lösungsmittel-Kontrolle mit 2 % Ethanol zeigte, auch nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen, keinen Einfluß auf die Vitalität. Es wurden praktisch identische Werte wie für die reine Zellsuspension erhalten.

MTT test on HT 29 stem cells

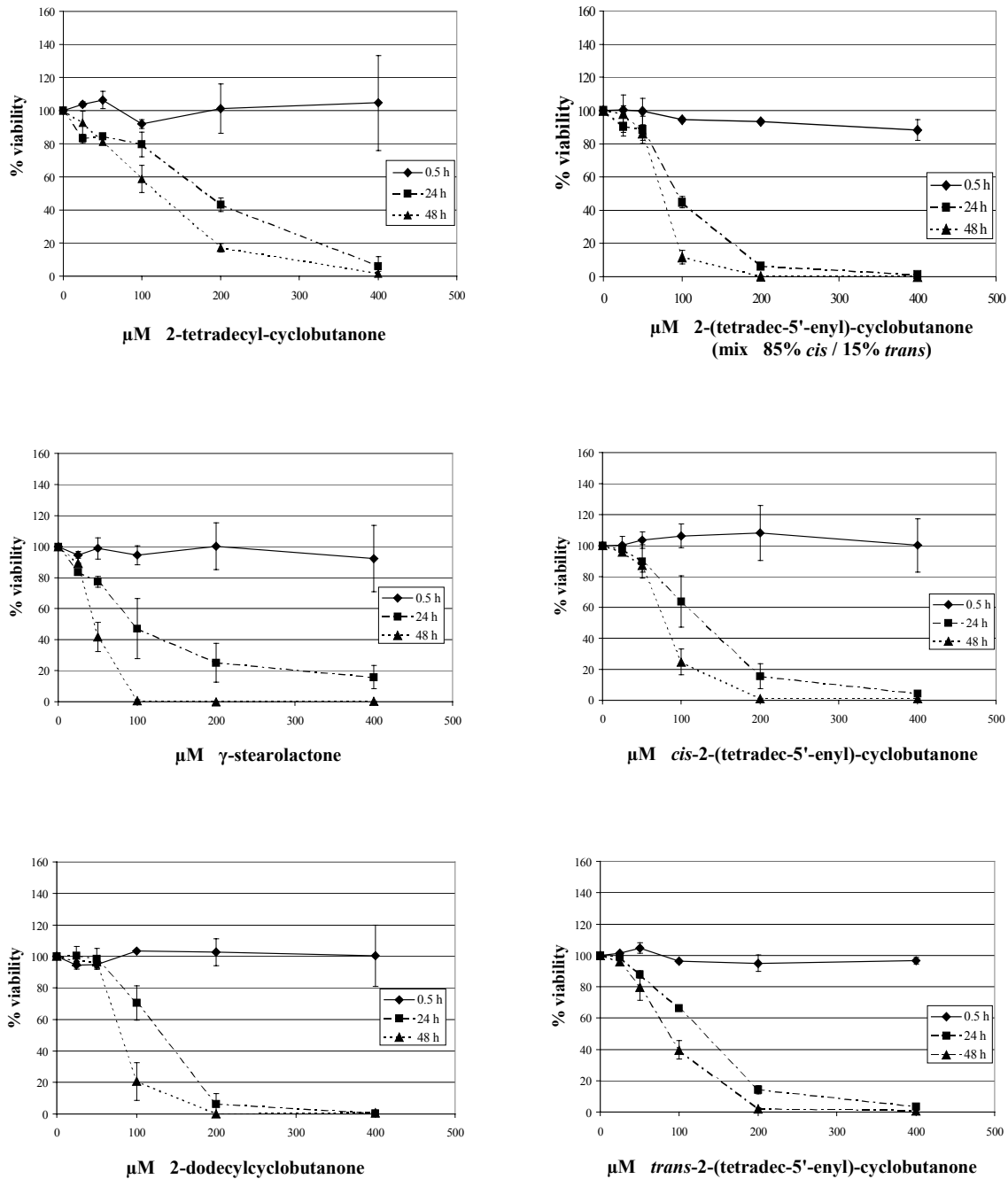


Abb. 27 Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit MTT - der 2-Alkylcyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in HT 29 Stammzellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2 % Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Beim Vergleich der Testsubstanzen fällt auf, dass das gesättigte 2-tDCB die geringste Cytotoxizität zeigt, während das ungesättigte 2-tDeCB bzw. das Oxidationsprodukt γ -Stearolacton eine niedrigere Zellvitalität aufweist. Auch das 2-Alkylcyclobutanon mit der kürzeren Kohlenwasserstoff-Kette, das 2-dDCB, zeigt eine höhere Cytotoxizität als das 2-tDCB.

Ähnliche Ergebnisse wurden für den Subclon HT 29 cl 19A erhalten (Abb. 28).

MTT test on HT 29 clone 19A cells

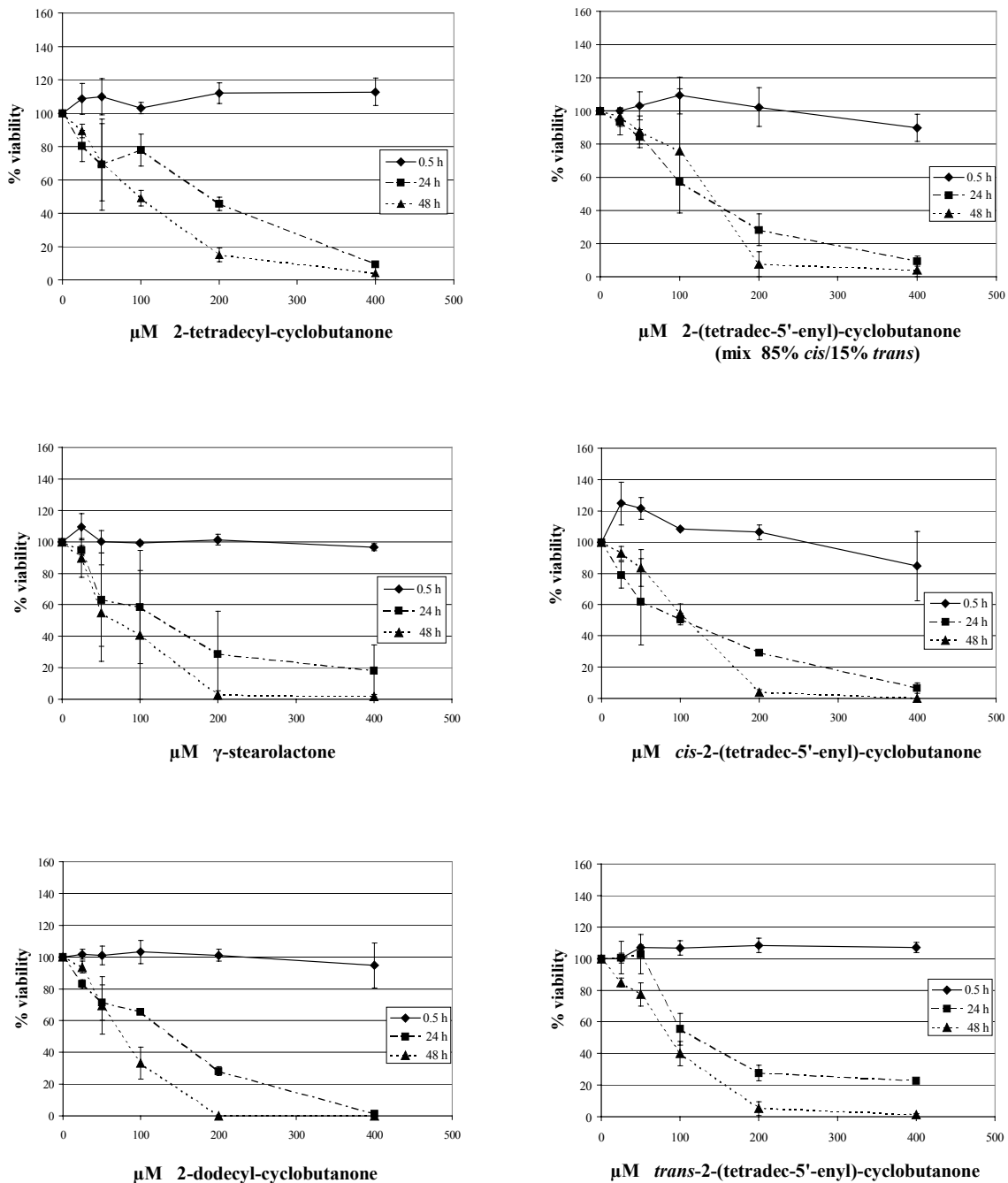


Abb. 28 Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit MTT - der 2-Alkyl-cyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in HT 29 cl 19A Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2 % Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Wenn die Cytotoxizitätsmessungen mit WST-1 durchgeführt wurden (Abb. 29, 30), war die Toxizität ebenfalls deutlich von der Zeit und der eingesetzten Konzentration der Testsubstanzen abhängig, obwohl die Wirkung geringer erschien als bei den Messungen mit MTT. Erst ab einer Konzentration $> 100 \mu\text{M}$ ist eine Abnahme der Zellvitalität bei längeren Inkubationszeiten (24 h und 48 h) zu beobachten. Abb. 29 und Abb. 30 zeigen die Ergebnisse bei den HT 29 Stammzellen bzw. den HT 29 cl 19A Clonzellen.

WST test on HT 29 stem cells

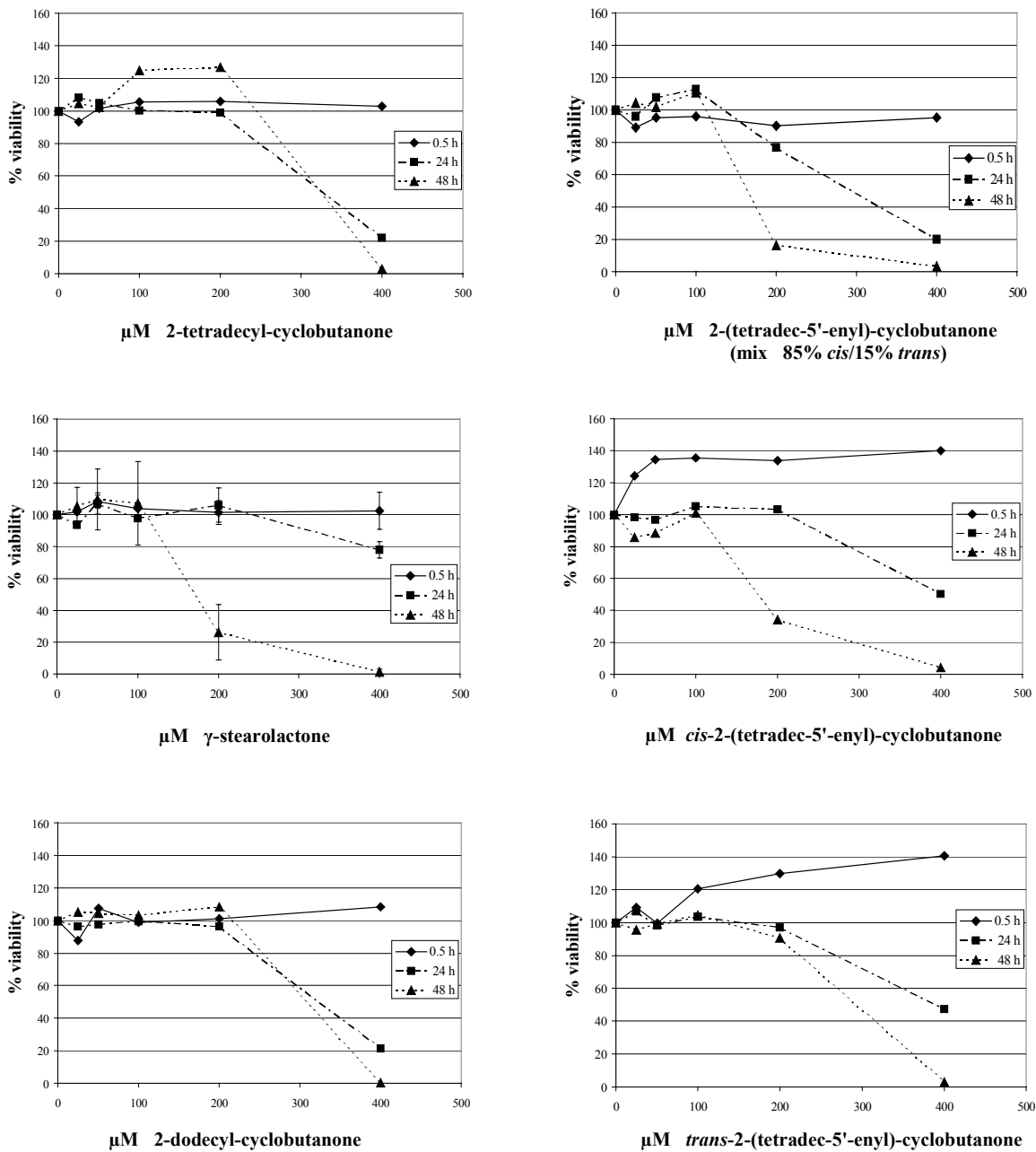


Abb. 29

Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit WST-1 - der 2-Alkyl-cyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in HT 29 Stammzellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2% Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

WST test on HT 29 clone 19A cells

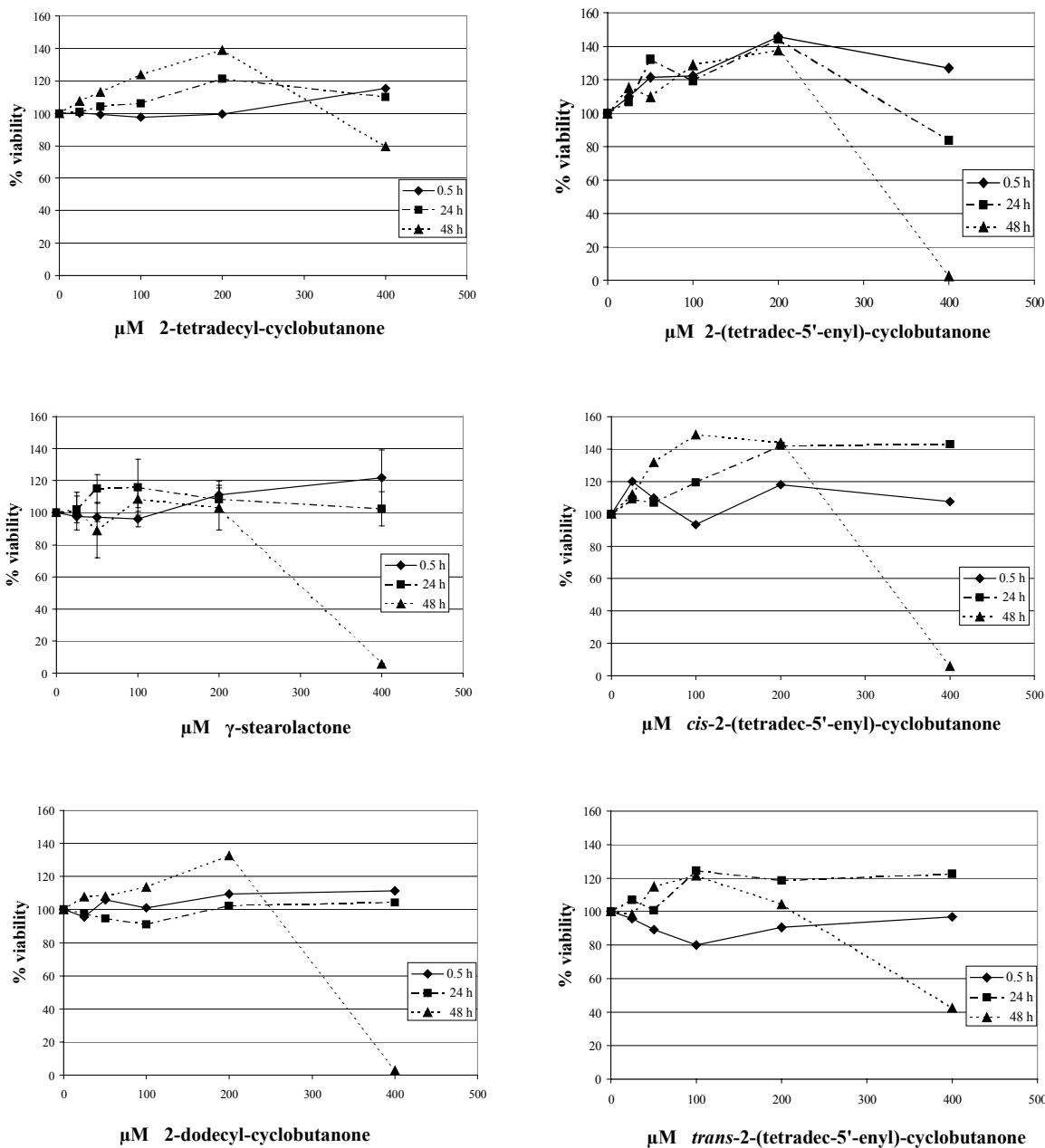


Abb. 30

Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit WST-1 - der 2-Alkyl-cyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in HT 29 cl 19A Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2 % Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Die Messung der Zellvitalität von konfluenten HT 29 cl 19A Zellen, die mit den Testsubstanzen inkubiert wurden, zeigte eine deutlich geringere Cytotoxizität (Abb. 31, 32) als die ersten Messungen. Dennoch wurde für einige Testsubstanzen bei längeren Inkubationszeiten (24 h und 48 h) und höheren Konzentrationen ($\geq 200 \mu\text{M}$) eine Abnahme der Vitalität unter 70 % festgestellt.

MTT test on HT 29 clone 19A cells (confluent)

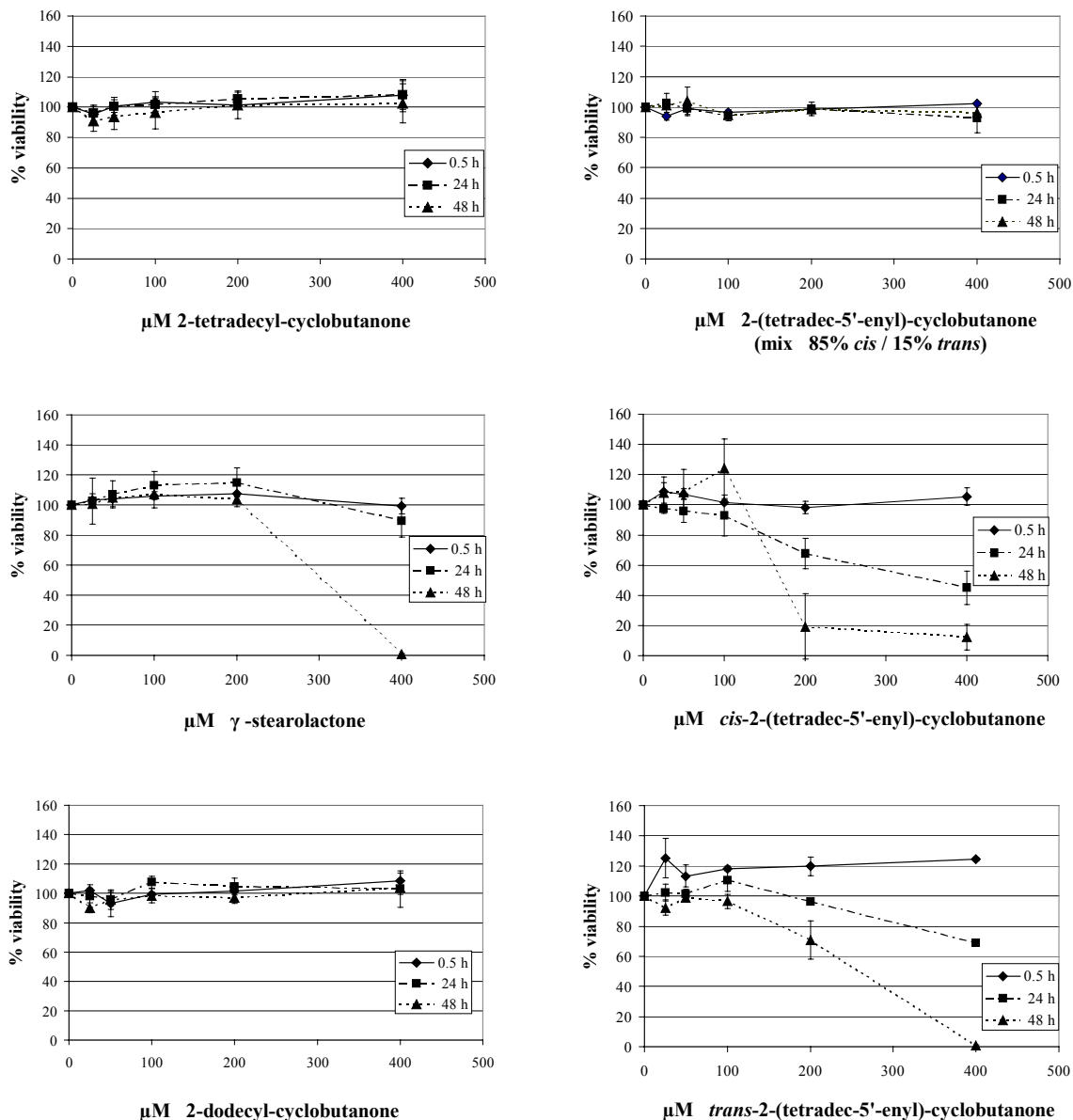


Abb. 31 Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit MTT - der 2-Alkyl-cyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in konfluenten HT 29 cl 19A Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2 % Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

WST test on HT 29 clone 19A cells (confluent)

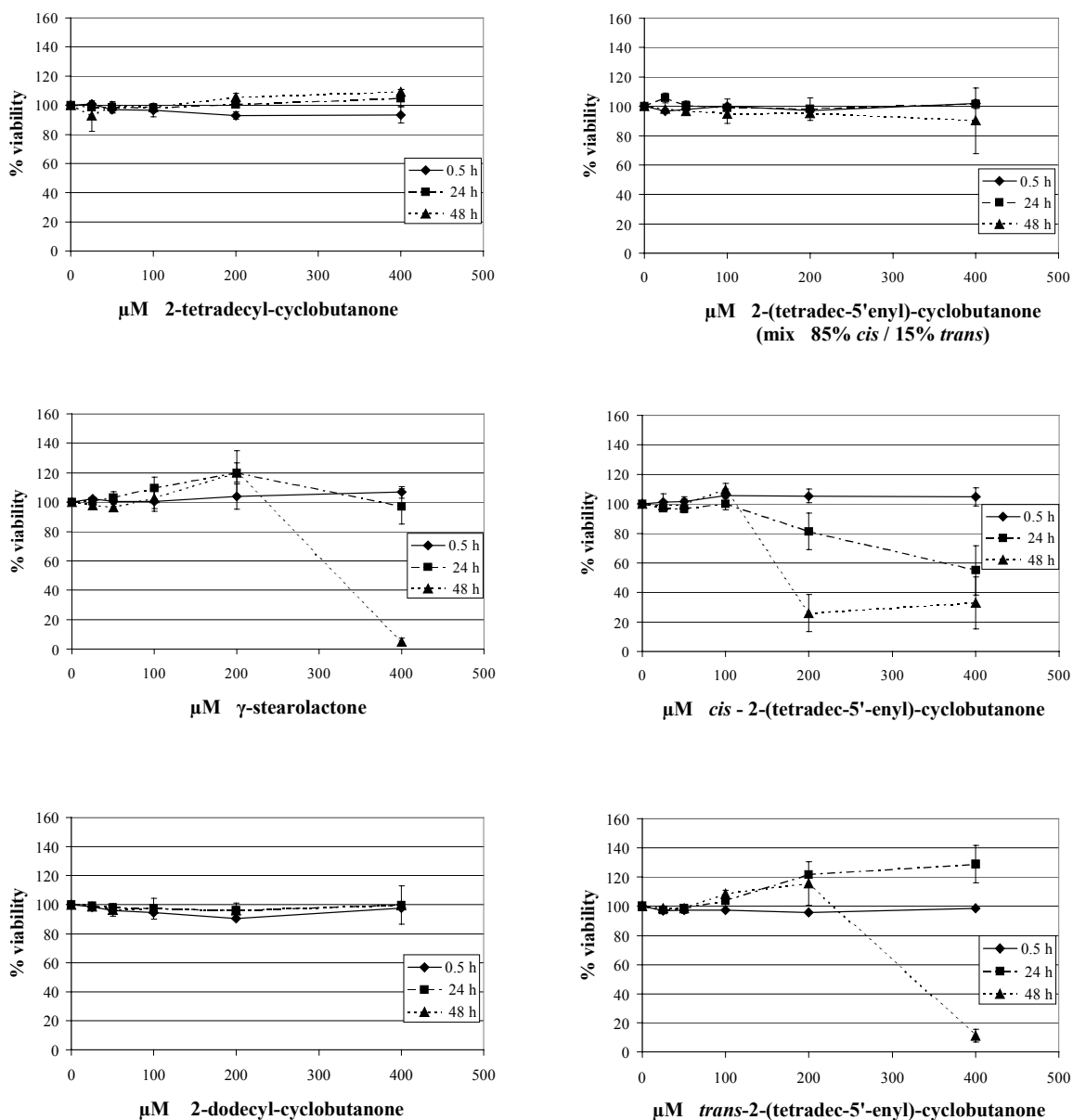


Abb. 32

Cytotoxizität - bestimmt durch Messung der Zellvitalität mit WST-1 - der 2-Alkyl-cyclobutanone bzw. des γ -Stearolactons in konfluenten HT 29 cl 19A Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen jeweils 0,5 h, 24 h und 48 h inkubiert wurden. (Die Meßwerte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle (2% Ethanol) berechnet, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Genotoxizität

Der Comet Assay wird als ein schnelles Screening-Verfahren betrachtet, um eine DNA-schädigende Wirkung einer Testsubstanz festzustellen (Henderson *et al.* 1998, Anderson *et al.* 1998, Tice *et al.* 2000). In einer früheren *in vitro* Studie (Delincée und Pool-Zobel 1998) mit 2-Dodecylcyclobutanon wurde bereits der Comet Assay zur Bestimmung der potentiellen Genotoxizität eingesetzt. Um das genotoxische Potential verschiedener 2-Alkylcyclobutanone bzw. eines von deren Oxidationsprodukten, das γ -Stearolacton, miteinander vergleichen zu können, wurde wiederum der Comet Assay in dieser *in vitro* Untersuchung mit Dickdarmzellen, hier Human-Colonzellen, eingesetzt.

Die aktuellen Richtlinien für toxikologische Untersuchungen mit dem Comet Assay (Tice *et al.* 2000) heben hervor, dass bei der Interpretation der Ergebnisse mit dem Comet Assay die möglichen negativen Effekte des DNA-Abbaus, verursacht durch eine Cytotoxizität, berücksichtigt werden müssen. Da bei Zelltod eine DNA-Schädigung auftritt, sollte beim Einsatz des Comet Assay die getestete höchste Konzentration keine übermäßige Cytotoxizität aufweisen. Deshalb sollten die Comet Assay-Experimente mit Versuchen zur Cytotoxizität begleitet werden.

In unseren jetzigen Untersuchungen wurden deshalb, zusätzlich zu den Bestimmungen der Zellvitalität mit dem Trypanblau-Exclusionstest im Comet Assay Experiment, Cytotoxizitätstests durchgeführt. Der Trypanblau-Test kann die Cytotoxizität unterbewerten, da er auf die Funktionsfähigkeit der Zellmembran abhebt und diese erst spät bei der einsetzenden Apoptose beeinflusst wird. Für die zusätzliche Bestimmung der Cytotoxizität wurde die Reduktion von Tetrazolium-Farbstoffen eingesetzt, hier MTT und WST-1, die mit der Zellvitalität korreliert.

In den Richtlinien zum Comet Assay wird empfohlen, keine Substanzen zu testen, die die Zellvitalität auf weniger als 70 % herabsetzen (Tice *et al.* 2000, Anderson *et al.* 1998, Henderson *et al.* 1998). Damit die Voraussetzungen erfüllt werden und damit eine Unterscheidung zwischen Genotoxizität und Cytotoxizität möglich bleibt, wurde für die jetzigen Untersuchungen, nach den Ergebnissen mit den Messungen zur Zellvitalität, für den Comet Assay eine kurze Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C gewählt. Damit ist auch ein Vergleich zu den früheren Untersuchungen möglich, bei denen ebenfalls 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurde, allerdings bei primären Ratten-Dickdarmzellen und bei Colonzellen aus Humanbiopsien (Delincée und Pool-Zobel, 1998).

Als Positivkontrolle wurde H₂O₂ eingesetzt, eine Substanz, die bekannterweise DNA-Schäden hervorruft (Collins *et al.* 1995, Pool-Zobel und Leucht, 1997, Pool-Zobel *et al.* 1999). Es wurde eine Konzentration von 500 μ M H₂O₂ gewählt, die nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C einen deutlichen Schaden setzt. Obwohl bei der Inkubation bei 37°C auch eine Reparatur der gesetzten H₂O₂-Schäden stattfindet (Collins *et al.* 1995, Vosseler, 2000), wurde die positive Kontrolle mit H₂O₂ unter den gleichen Bedingungen wie die Testsubstanzen inkubiert. Das H₂O₂ wurde in Zellmedium gelöst. Als Negativkontrolle wurde entweder EtOH, 0,9 % NaCl oder H₂O zugegeben, bzw. nur Zellsuspension eingesetzt. Die Endkonzentration von EtOH betrug 2 % (20 μ l Testsubstanz in Ethanol wurden zu 1 ml Zell-Lösung hinzugegeben).

Die Ausgangsvitalität (Trypanblau) der Zellen lag sowohl bei HT 29 Stamm- als auch beim Clon HT 29 cl 19A im Bereich 95 - 99 %. Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen war die Vitalität nur geringfügig beeinflusst und lag im Bereich 80 - 99 %, eine Abhängigkeit von der Konzentration war dabei nicht zu beobachten.

Abb. 33 und 34 zeigen die Auswertung des Comet Assays bei Einwirkung von den 2-Alkylcyclobutanonen bzw. des γ -Stearolactons auf HT 29 Stammzellen und HT 29 cl 19A Clonzellen. Die Ordinate weist die "Tail intensity" auf : % Fluoreszenz im Schweif.

Comet Assay on HT 29 stem cells

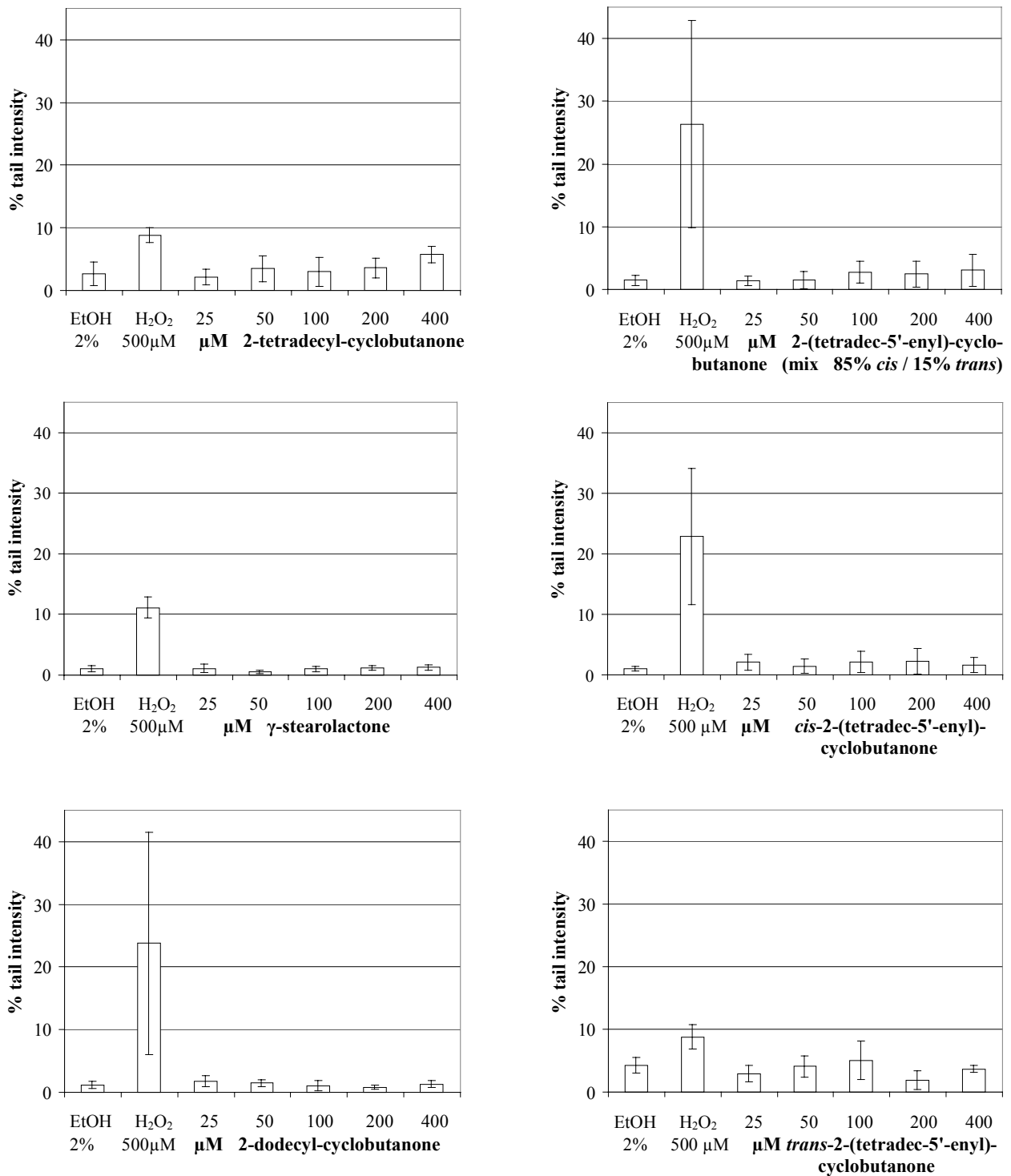


Abb. 33

Comet Assay von HT 29 Stamm-Zellen nach Inkubation (30 Min. bei 37°C) mit 2-Alkylcyclobutanonen bzw. dem γ -Stearolacton. Die Ordinate zeigt die "Tail intensity" (% Fluoreszenz im Schweif) als Maß für die DNA-schädigende Wirkung (DNA-Einzelstrangbrüche). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Versuchen, bei denen je 2-3 Objektträger mit je 50 Zellen ausgewertet wurden.

Comet Assay on HT 29 clone 19A cells

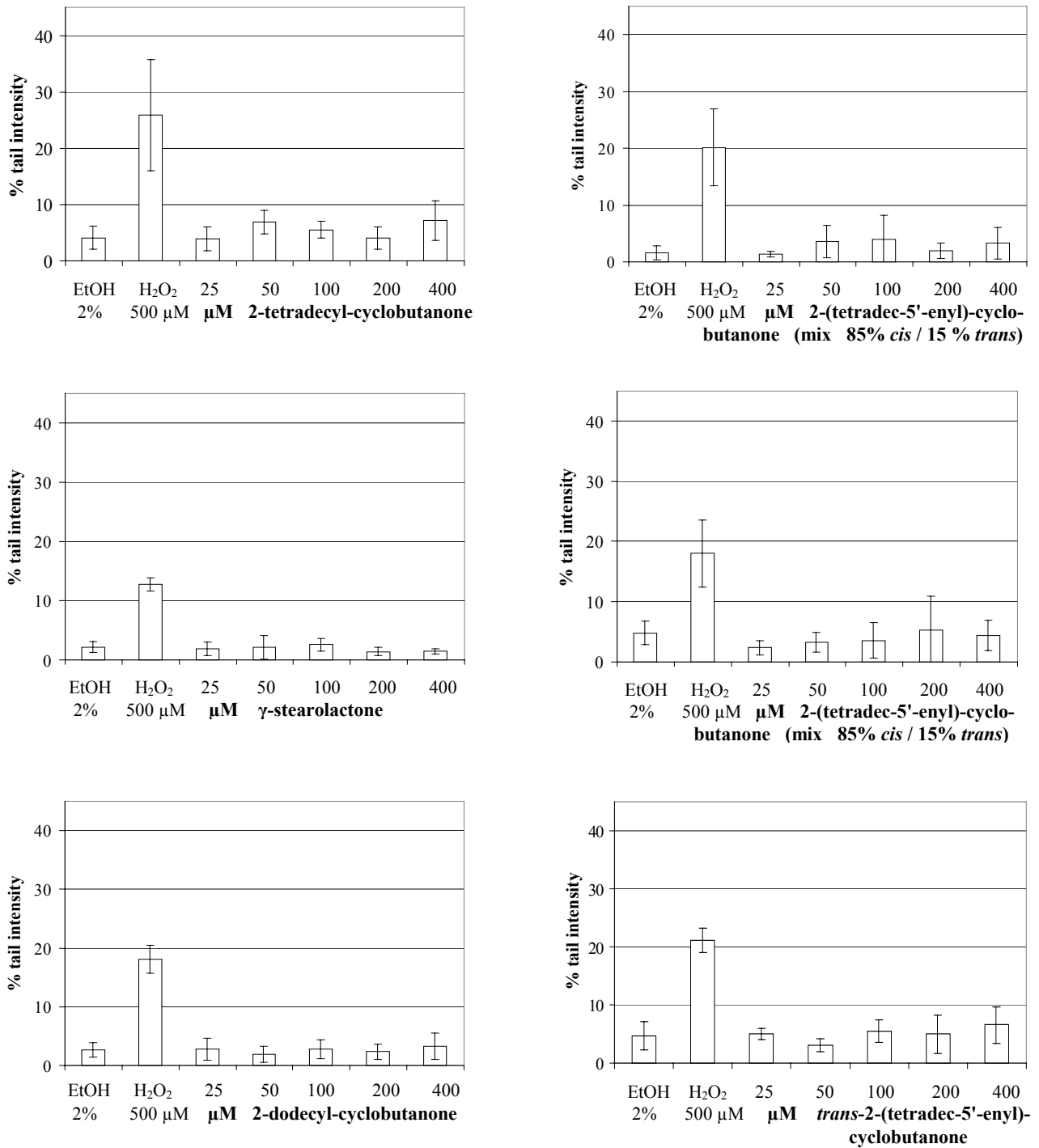


Abb. 34 Comet Assay von HT 29 cl 19A Clon-Zellen nach Inkubation (30 Min. bei 37°C) mit 2-Alkylcyclobutanonen bzw. dem γ -Stearolacton. Die Ordinate zeigt die "Tail intensity" (% Fluoreszenz im Schweif) als Maß für die DNA-schädigende Wirkung (DNA-Einzelstrangbrüche). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Versuchen, bei denen je 2-3 Objektträger mit je 50 Zellen ausgewertet wurden.

Eine deutliche konzentrations-abhängige Schädigung der DNA durch 2-Alkylcyclobutanone bzw. das γ -Stearolacton in den angewandten Zell-Linien ist unter den angewandten Inkubationsbedingungen nicht erkennbar. Obwohl bei den HT 29 Stammzellen die Streuung bei der Positiv-Kontrolle (500 μ M H₂O₂) groß ist, sind die Werte der 2-Alkylcyclobutanone doch deutlich niedriger und vergleichbar mit den Werten der Negativ-Kontrolle (2 % EtOH). Auch bei den Clon-Zellen ist eine erhöhte DNA-Schädigung bei den eingesetzten Testsubstanzen nicht zu beobachten. Eine längere Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen würde vielleicht eine zunehmende DNA-Schädigung zeigen, jedoch wäre diese dann nicht von einer cytotoxischen Wirkung zu unterscheiden. Die höchste Konzentration, die in den jetzigen Versuchen eingesetzt wurde, betrug 400 μ M, welches in etwa 100 μ g / ml entspricht. Diese Konzentration - bedingt durch die Löslichkeit des 2-Tetradecyl-cyclobutanons - ist niedriger als diejenigen in früheren Untersuchungen, in denen 300 - 1250 μ g / ml 2-Dodecyl-cyclobutanon eingesetzt wurden (Delincée und Pool-Zobel, 1998). Weitere Versuche mit erhöhten Mengen an 2-dDCB, das eine erheblich größere Löslichkeit als 2-tDCB besitzt, sind vorgesehen. Wenn man jedoch überlegt, dass z.B. bei der Bestrahlung von Hähnchen etwa 0,3 μ g 2-dDCB / g Fett / kGy gebildet werden (Stevenson 1996, Ndiaye *et al.* 1999), sind die getesteten Mengen sehr hoch im Vergleich zu den voraussichtlichen Mengen, die beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln eingenommen werden.

Es sollte auch berücksichtigt werden, dass der Comet Assay nur einen von vielen möglichen Tests zur Bestimmung des toxikologischen Potentials darstellt. Andere Untersuchungsverfahren mit verschiedenen Endpunkten sollten eingesetzt werden, um ein größeres Verständnis über die toxikologische Bedeutung der 2-Alkylcyclobutanone zu gewinnen. Obwohl der Comet Assay eine hohe Empfindlichkeit für krebserregende Substanzen zeigt, ist seine Spezifität noch nicht festgelegt, da die Gesamtmenge an Daten mit dem Comet Assay noch unzureichend ist (Anderson *et al.* 1998). Diese Autoren erwähnen auch, dass die Bedeutung eines positiven Ergebnisses des Comet Assays noch nicht völlig verstanden wird. Ob die beobachtete DNA-Schädigung tatsächlich biologisch relevant ist, sei noch unklar. So zeigen Vitamin C und auch das Flavonoid Rutin ein positives Ergebnis beim Comet Assay, obwohl beide Substanzen als anti-genotoxisch gelten. Der Comet Assay ist bis jetzt auch nicht für gesetzliche Zwecke validiert worden, doch laufen weitere Arbeiten, um ein besseres Verständnis zu ermöglichen. Andere toxikologische Prüfverfahren, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sollten deshalb eingesetzt werden, um die erhaltenen Ergebnisse durch den Comet Assay zu ergänzen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Beim Einsatz von Human-Colontumor-Zell-Linien HT 29 und HT 29 cl 19A als *in vitro* Modellversuch für die Einwirkung von 2-Alkylcyclobutanonen auf Dickdarmzellen, wird nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C weder eine Genotoxizität noch eine Cytotoxizität festgestellt. Bei längeren Einwirkungszeiten (1-2 Tage) und höheren Konzentrationen ($\geq 50 \mu$ M) wirken die Testsubstanzen cytotoxisch. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass die eingesetzten Mengen sehr hoch sind im Vergleich zu den Mengen, die beim Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln eingenommen werden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um das toxikologische Potential der 2-Alkylcyclobutanone beurteilen zu können.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Projekt mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau S. Vollmer, Frau S. Delincée und Frau R. Lambertz für ihre hervorragende technische Mitarbeit.

LITERATUR

Abrahamse, S.L., Rechkemmer, G. (2001) Identification of an organic anion transport system in the human colon carcinoma cell line HT-29 clone 19A. *Pflügers Arch.*, **441**, 529-537.

Anderson, D., Yu, T-W., McGregor, D.B. (1998) Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, **13**, 539-555.

Augeron, C., Laboisie, C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.*, **44**, 3961-3969.

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Boehringer Biochemica*, **4**, 14-19.

Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J. (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutation Res.*, **336**, 69-77.

Cook, J.A., Mitchell, J.B. (1989) Viability Measurements in Mammalian Cell Systems. *Anal. Biochem.*, **179**, 1-7.

Delincée, H., Pool-Zobel, B.L. (1998) Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 39-42.

Delincée, H., Pool-Zobel, B.-L., Rechkemmer, G. (1999) Genotoxizität von 2-Dodecylcyclobutanon. In '5. Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung' (M. Knörr, D.A.E. Ehlermann, H. Delincée, eds.), Karlsruhe, 11-12 Nov. 1998, Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, BFE-R--99-01, 262-260.

Drexler, H.G., Dirks, W., MacLeod, R.A.F., Quentmeier, H., Steube, K., Uphoff, C.C., Eds. (1997) *DSMZ Catalogue of Human and Animal Cell Lines*. 6. Ed., Braunschweig.

Fogh, J., Fogh, J.N., Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty seven cultured human tumor cell-lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 221-226.

Green, L.M., Reade, J.L. and Ware, C.F. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunol. Methods*, **70**, 258-268.

Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, **13**, 89-94.

Horvatovich, P. (2001) Formation des 2-alkylcyclobutanones à partir des triglycérides dans les aliments traités par ionisation. Doctorat de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., Watanabe, M. (1995) Novel Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays Using a Tetrazolium Salt that Produces a Water-Soluble Formazan Dye. *In Vitro Toxicology*, **8**, 187-190.

Miesch, M., Ndiaye, B., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs - I. Synthesis of saturated and unsaturated standards. *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.

Miesch, M., Horvatovich, P., Marchioni, E. (2001) Personal communication.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

Ndiaye, B., Jamet, G., Miesch, M., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs – II. The CEN (European Committee for Standardization) method: field of application and limit of utilization. *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 437-445.

Pool, B.-L., Brendler, S.Y., Liegibel, U.M., Tompa, A., Schmezer, P. (1990) Employment of adult mammalian primary cells in toxicology: *In vivo* and *in vitro* genotoxic effects of environmentally significant N-nitrosodialkylamines in cells of the liver, lung and kidney. *Environ. Mol. Mutagen.*, **15**, 24-35.

Pool-Zobel, B.-L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U., Schröder, H.-G., Schmezer, P. (1994) Detection of Genotoxic Effects in Human Gastric and Nasal Mucosa Cells Isolated from Biopsy Samples. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 23-45.

Pool-Zobel, B.L. and Leucht, U. (1997) Induction of DNA damage in human colon cells from biopsies by suggested risk factors of colon cancer. *Mutation Res.*, **375**, 105-115.

Pool-Zobel, B.-L., Bub, A., Schröder, N., Rechkemmer, G. (1999) Anthocyanines are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur. J. Nutr.*, **38**, 227-234.

Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B*, **722**, 225-254.

Stevenson, M. H. (1996) Validation of the Cyclobutanone Protocol for Detection of Irradiated Lipid Containing Foods by Interlaboratory Trial. In: *Detection Methods for Irradiated Foods - Current Status*. McMurray, C., Stewart, E. M., Gray, R. Pearce, J. (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 269-284.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F. (2000) Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, **35**, 206-221.

Vosseler, C. (2000) Modulation der DNA-Reparatur in HT 29 clone 19A - Zellen durch β -Carotin. Diplomarbeit, Institut für Ernährungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Wollowski, I. (1998) Untersuchungen zu protektiven Wirkungen von Bakterienmetaboliten auf molekulare Prozesse der Kolonkarzinogenese. Dissertation Universität Gießen, Fachverlag Köhler, Gießen.

2.6.2 Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-Alkylcyclobutanone in HeLa-Zellen, sowie in Colontumor-Zellen (HT 29)

Andrea Hartwig und Anke Pelzer

Universität Karlsruhe, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruhe, Germany

FRAGESTELLUNG

Ziel der Arbeiten in unserem Labor ist die Untersuchung von oxidativen DNA-Schäden durch die unterschiedlichen 2-Alkylcyclobutanone in kultivierten HeLa-Zellen sowie in Colontumorzellen. Als Indikator dienen sowohl DNA-Strangbrüche als auch oxidative DNA-Modifikationen, darunter das prämutagene 8-Oxoguanin.

METHODISCHER ANSATZ

Die Quantifizierung spezifischer oxidativer DNA-Basenschäden erfolgt mit Hilfe eines schadensspezifischen, isolierten DNA-Reparaturenzyms. Hierfür wurde von uns ein Testsystem etabliert, bei dem der Nachweis oxidativer DNA-Schäden durch den Einsatz der Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg-Protein) in Kombination mit der Methode des "Alkaline Unwinding" erfolgt (Hartwig *et al.*, 1996). Bei dem Fpg-Protein handelt es sich um ein bakterielles Reparaturenzym, welches spezifische, geschädigte DNA-Basen aus der DNA herauschneidet und mit Hilfe einer Endonuclease-Aktivität an den resultierenden apurinischen/apyrimidinischen Stellen im Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA einschneidet und somit zu Einzelstrangbrüchen führt. Es erkennt sowohl 8-Oxoguanin als auch die Imidazolring-geöffneten Purine 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapyGua) und 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin (FapyAde) sowie geringe Mengen an 8-Hydroxyadenin, wobei die Affinität zu 8-Oxoguanin höher ist und dieses auch als das physiologische Substrat gilt (Boiteux *et al.*, 1992; Tchou *et al.*, 1991). Zum Nachweis Fpg-sensitiver Stellen in intakten Zellen werden die Zellen vorsichtig lysiert, die Histone durch Zugabe einer 2 M NaCl-Lösung entfernt und die hierbei entstehenden Nucleoide anschließend mit dem Fpg-Protein inkubiert. Die Anzahl der DNA-Strangbrüche wird durch die Technik des "Alkaline Unwinding" bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte Methode zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen, die im Detail von Ahnström und Erixon (1981) beschrieben wurde. Das Fpg-Protein wird uns von Dr. Serge Boiteux, Fontenay aux Roses, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

Diese Methode weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Nachweisverfahren wie beispielsweise HPLC mit elektrochemischer Detektion auf. Zum einen ist sie schnell, benötigt nur geringe Zellzahlen (ca. 3×10^5 Zellen pro Probe) und erlaubt die Analyse einer vergleichsweise hohen Anzahl von Parallelproben (ca. 40). Zudem ist die Methode sehr empfindlich; so können ca. 500 Fpg-sensitive DNA-Läsionen pro Zelle nachgewiesen werden, was unter der Annahme von ca. $1,2 \times 10^{10}$ Basen pro diploidem Genom einer Schadenshäufigkeit von ca. 5 Läsionen pro 10^8 DNA-Basen entspricht.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels

Zunächst wurde ein geeignetes Lösungsmittel gesucht, welches einerseits als Lösungsvermittler zwischen den weitgehend hydrophoben 2-Alkylcyclobutanonen und dem wäßrigen Milieu fungiert und andererseits aber auch weder selbst oxidative DNA-Schäden induziert noch reaktive Sauerstoffspezies "quenscht". Da die Tierversuche bereits mit Ethanol als Lösungsmittel gestartet wurden, wurde getestet, inwieweit Ethanol auch für unsere Untersuchungen geeignet ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt: 2 % Ethanol im Zellkulturmedium induzieren weder DNA-Strangbrüche noch haben sie einen signifikanten Einfluß auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch H_2O_2 . Somit ist Ethanol als Lösungsvermittler für die weiteren Untersuchungen geeignet.

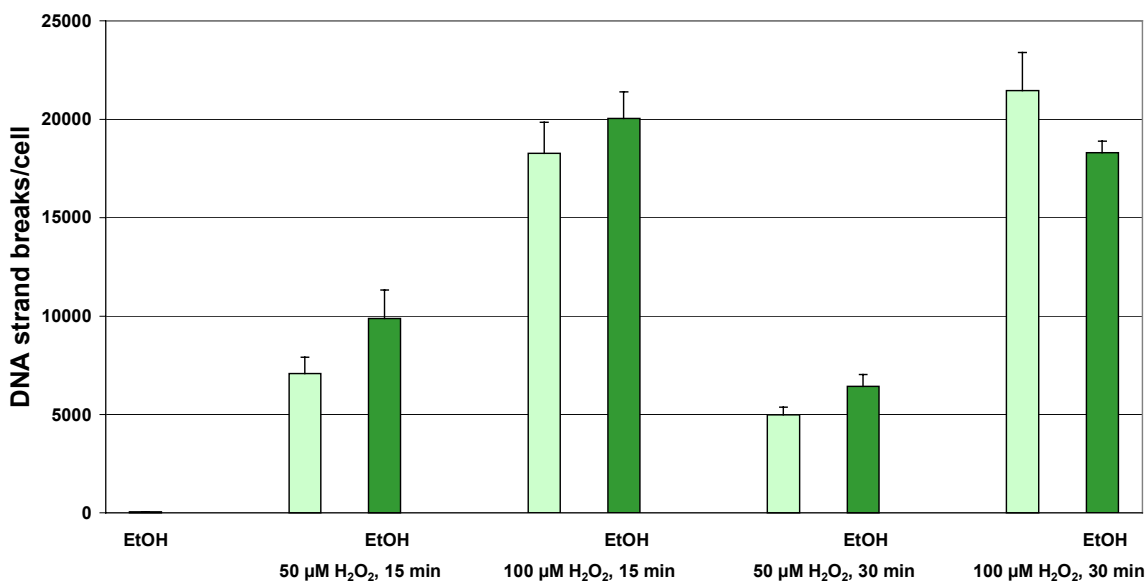


Abb. 35: *Einfluß von 2 % Ethanol im Medium auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen in HeLa-Zellen. Getestet wurden sowohl die Strangbrüche allein als auch in Kombination mit H_2O_2 als Strangbruch-induzierendem Agens nach 24 h Inkubation in Zellkulturmedium.*

2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB)

Um einen optimalen Konzentrationsbereich abzuklären, wurde zunächst die Cytotoxizität von 2-tDCB untersucht. Als empfindlicher Parameter wurde hierfür die Koloniebildungsfähigkeit gewählt, die das langfristige Überleben und die Reproduktionsfähigkeit der Zellen mit berücksichtigt. Konzentrationen bis zu 50 µg/ml 2-tDCB führen zu keiner erkennbaren Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit; höhere Konzentrationen sind jedoch deutlich cytotoxisch (Abb. 36). Betrachtet man die Induktion oxidativer DNA-Schäden, so ist im unteren Konzentrationsbereich ein dosisabhängiger Anstieg an DNA-Strangbrüchen zu beobachten, wohingegen die Anzahl Fpg-sensitiver DNA-Läsionen erst bei sehr toxischen Konzentrationen signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht wird.

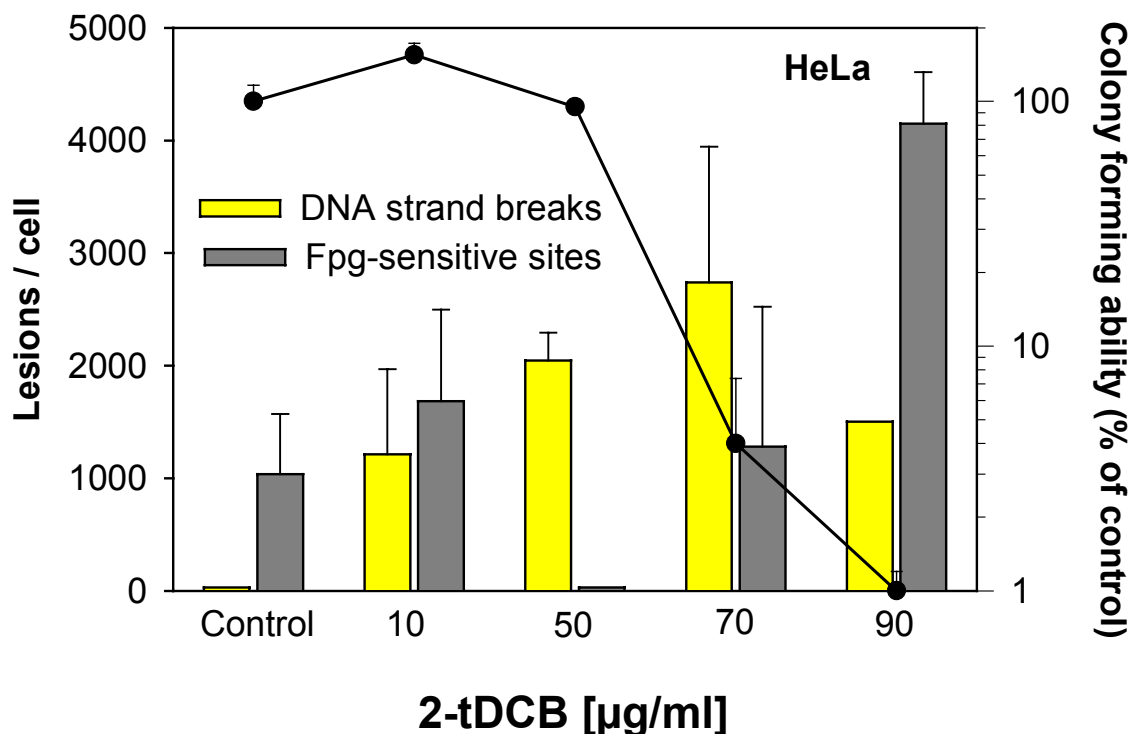


Abb. 36: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-tDCB nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt (Ausnahme: 90 µg/ml 2-tDCB; hier ist der Mittelwert aus einer Doppelbestimmung gezeigt). Bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB)

Um zu untersuchen, inwieweit das Vorhandensein einer Doppelbindung im 2-Alkylcyclobutanon die Cytotoxizität und die Induktion oxidativer DNA-Schäden beeinflusst, wurde 2-tDeCB getestet, welches sich von der Ölsäure ableitet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt: auch hier ist der Anstieg an DNA-Strangbrüchen und an Fpg-sensitiven Stellen auf cytotoxische Konzentrationen beschränkt.

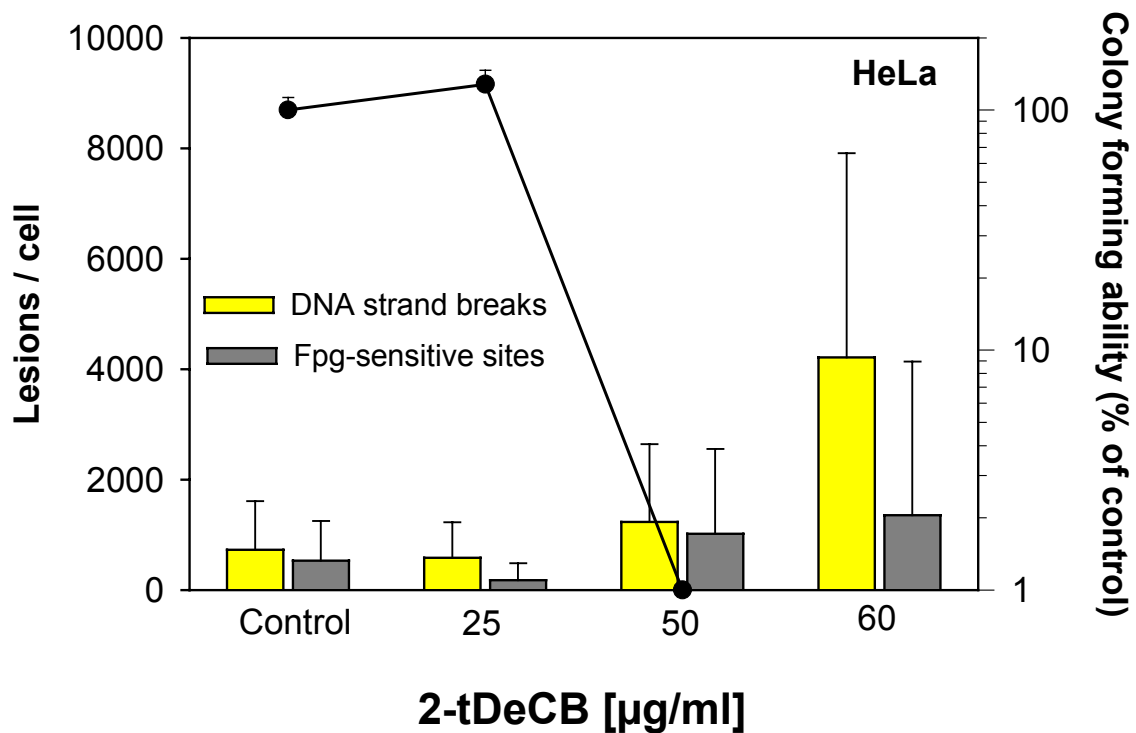


Abb. 37: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-tDeCB nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

2-Dodecylcyclobutanon (2-dDCB) und 2-Decylcyclobutanon (2-DCB)

Im folgenden wurde getestet, inwieweit die Kettenlänge der zugrunde liegenden Fettsäuren einen Einfluss auf die getesteten Parameter haben. Zunächst wurde 2-dDCB untersucht, welches aus Palmitinsäure gebildet wird (Abbildung 38). Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg Fpg-sensitiver DNA-Basenschäden und ein leichter Anstieg an DNA-Strangbrüchen bereits im nicht cytotoxischen Konzentrationsbereich von 10 bis 30 µg/ml, der sich bei 40 µg/ml fortsetzte. Ein sehr ähnliches Ergebnis ergab die Untersuchung von 2-DCB (Abbildung 39).

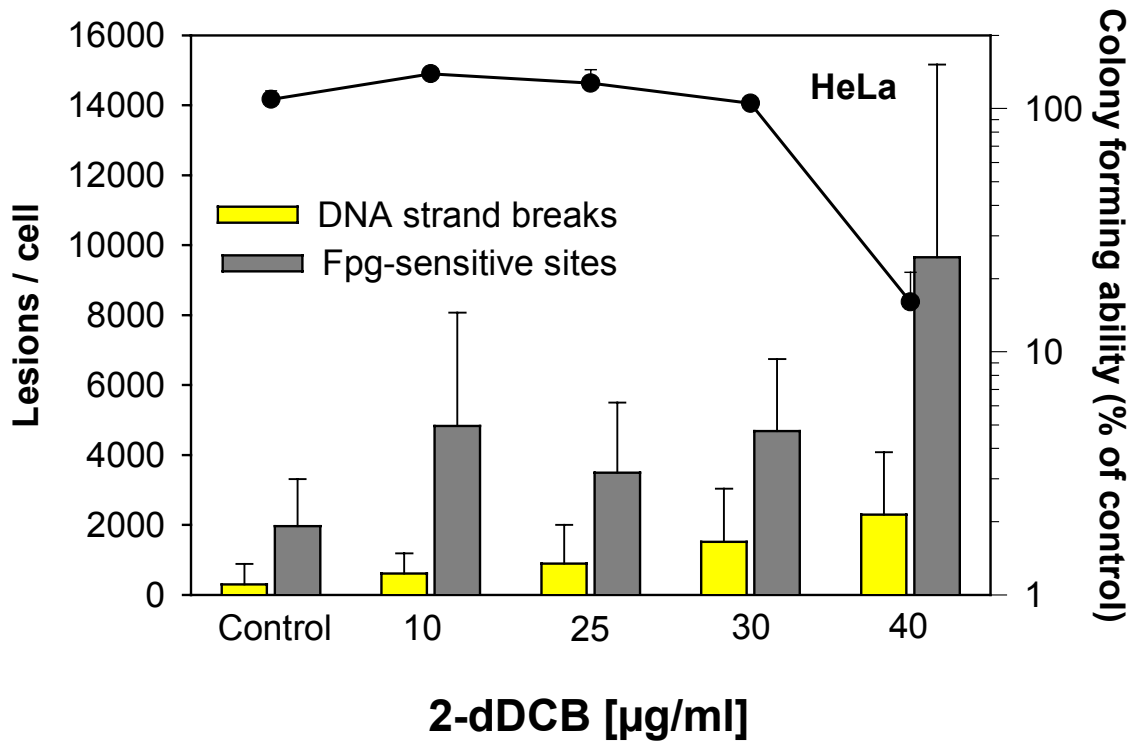


Abb. 38: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-dDCB nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

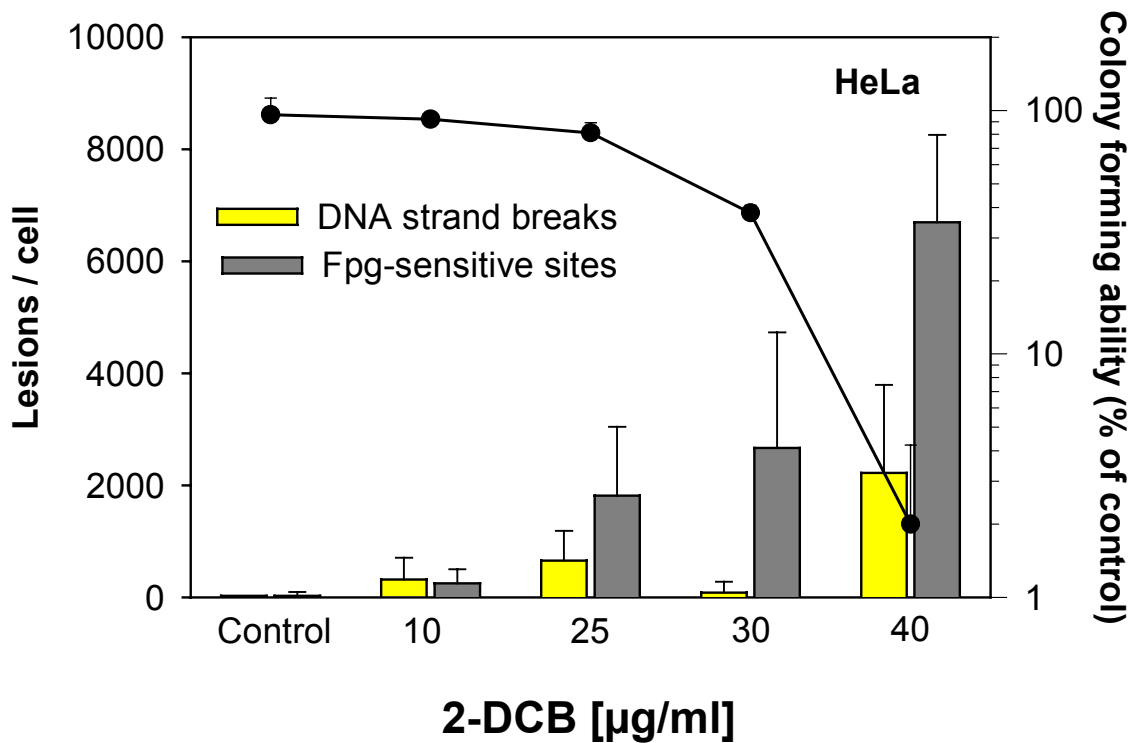


Abb. 39: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-DCB nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

γ -Stearo-Lacton (γ -stearo-L)

Die durch Bestrahlung von fetthaltigen Lebensmitteln gebildeten 2-Alkylcyclobutanone können eventuell zu den entsprechenden Lactonen oxidiert werden. Daher wurde das Lacton, welches sich von der Stearinsäure bzw. dem entsprechenden 2-Alkylcyclobutanon ableitet, in die Untersuchungen mit einbezogen. Hier zeigte sich, dass dieses ebenfalls im nicht cytotoxischen Konzentrationsbereich hauptsächlich oxidative DNA-Basenschäden in HeLa-Zellen induziert (Abbildung 40).

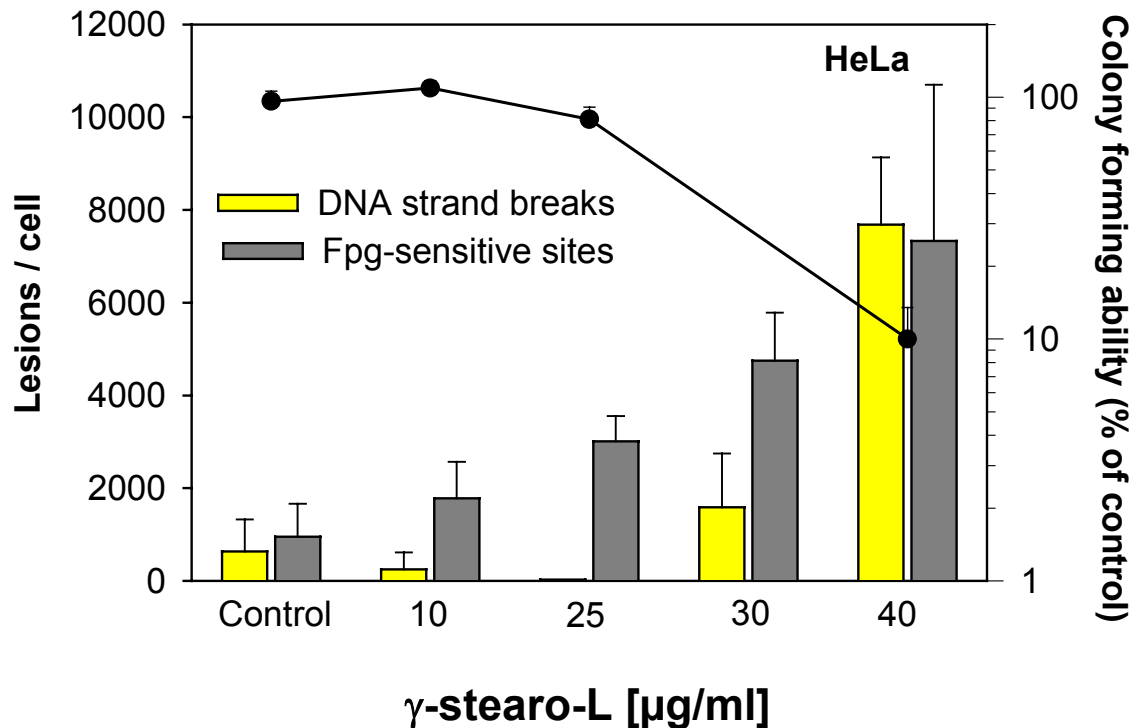


Abb. 40: *Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch γ -stearo-L nach 24 h Inkubation in HeLa-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.*

Bislang wurden die Untersuchungen in HeLa-Zellen, einer menschlichen Tumorzelllinie, durchgeführt. Unklar ist jedoch, ob diese DNA-Schäden in vergleichbarem Ausmaß auch in Darmzellen auftreten. Daher wurden zwei Verbindungen, nämlich 2-DCB und γ -stearo-L, zusätzlich in HT 29-Zellen getestet. Hierbei handelt es sich um eine gut charakterisierte menschliche Colon-Tumorzelllinie (Augeron und Laboisse, 1984). Wie in Abbildungen 41 und 42 dargestellt, ist in diesen Zellen zumindest im Fall des Lactons die Induktion Fpg-sensitiver DNA-Basenschäden noch wesentlich ausgeprägter.

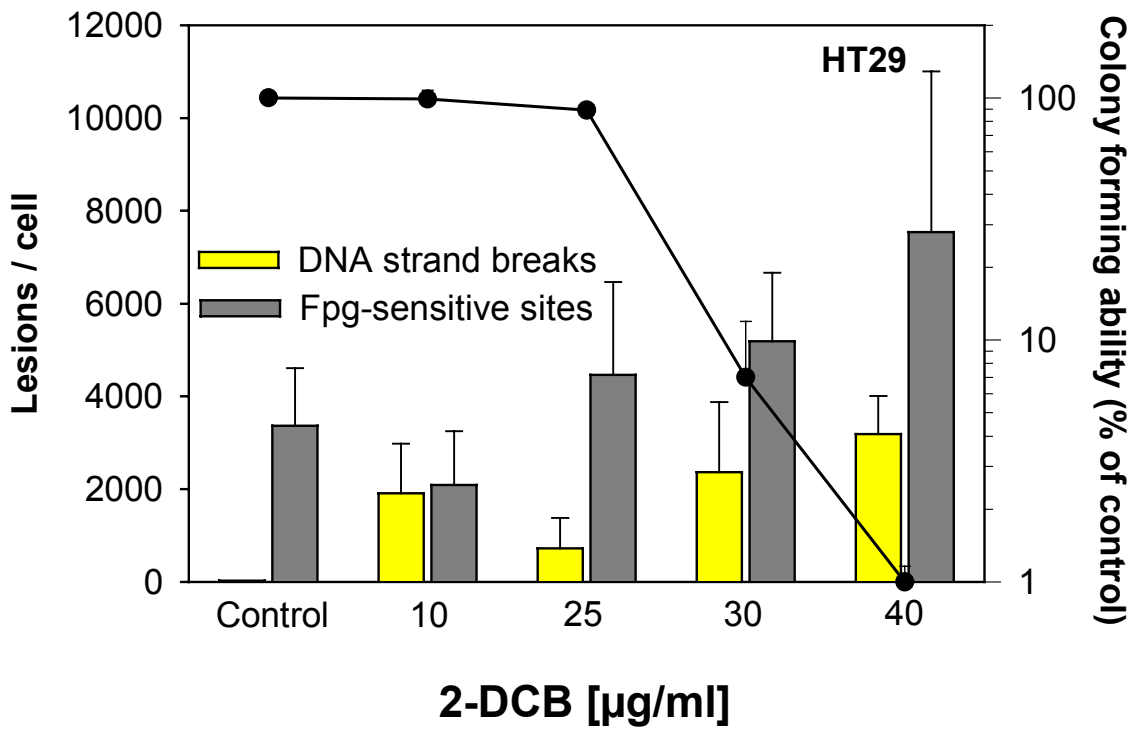


Abb. 41: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-DCB nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

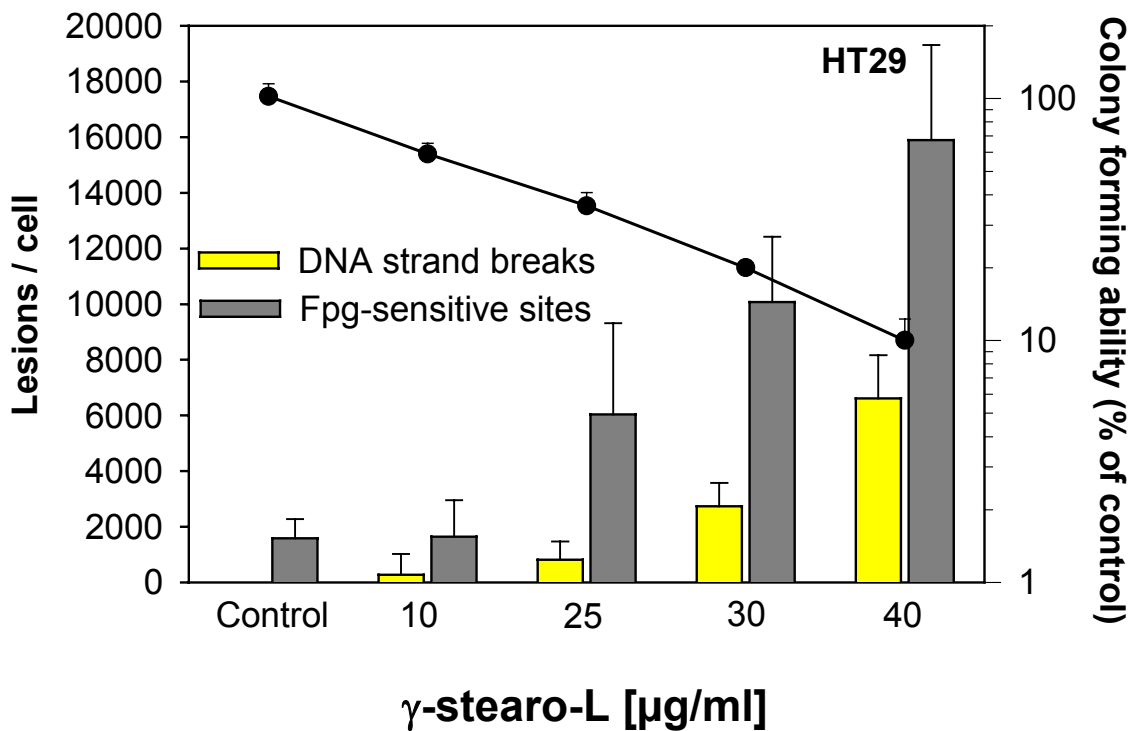


Abb. 42: Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch γ -stearo-L nach 24 h Inkubation in HT29-Zellen. Im Fall der oxidativen DNA-Schäden sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD dargestellt; bei den Werten zur Koloniebildungsfähigkeit handelt es sich um Mittelwerte aus Sechsfachbestimmungen + SD.

Zusammenfassend zeigen unsere bisherigen Ergebnisse, dass alle untersuchten Verbindungen cytotoxisch in beiden eingesetzten Zelllinien sind. Auch die Induktion oxidativer DNA-Schäden konnte für alle 2-Alkylcyclobutanone und das Lacton nachgewiesen werden. Bei den längerkettigen 2-Alkylcyclobutanonen, die sich von der gesättigten Stearinsäure (2-tDCB) oder von der einfach ungesättigten Ölsäure (2-tDeCB) ableiten, traten diese DNA-Schäden allerdings erst bei den Konzentrationen auf, die schon sehr cytotoxisch waren, so dass die Zellen nicht mehr lebensfähig sind. Anders sah es dagegen bei den kürzerkettigen 2-Alkyl-cyclobutanonen aus, die sich von der Palmitinsäure (2-dDCB) bzw. der Myristinsäure (2-DCB) ableiten: Hier traten oxidative DNA-Schäden schon bei nicht-cytotoxischen Konzentrationen auf, so dass diese Ergebnisse für die toxikologische Beurteilung relevanter sind. Gleiches gilt auch für das untersuchte Lacton (γ -stearo-L), welches insbesondere in HT 29 - aber auch in HeLa-Zellen in hohem Ausmaß oxidative DNA-Schäden induzierte.

Welche Bedeutung die Befunde für die Risikobewertung bestrahlter Lebensmittel haben, hängt von den tatsächlich in fetthaltigen Lebensmitteln gefundenen Konzentrationen der jeweiligen 2-Alkylcyclobutanone ab. Darüber hinaus muß abgeklärt werden, ob das untersuchte Lacton tatsächlich gebildet wird; ist dies der Fall, müssen in weiteren Studien auch kürzerkettige Lactone einbezogen werden.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Herrn M. Chavillie für seine technische Unterstützung.

LITERATUR

Ahnström, G., Erixon, A. (1981) Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: E.C. Friedberg and P.C. Hanawalt (Eds.) *DNA Repair*. Vol. 1, Marcel Dekker Inc. New York, Basel, pp. 403 - 418.

Augeron, C., Laboisse, C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.*, **44**, 3961 - 3969.

Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., Dizdaroglu, M. (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, **31**, 106 - 110.

Hartwig, A., Dally, H., Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: Use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, **88**, 85 -90.

Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A.P., Nishimura, S. (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4690 - 4694.

2.6.3. Toxikologische Effekte in Bakterien durch 2-Alkylcyclobutanone

Hélène Titeca, Robert P.P. Fuchs und Dominique Y. Burnouf
Groupe d'Epidémiologie Moléculaire du Cancer,
UPR 9003 du CNRS, conventionnée avec l'IRCAD, Strasbourg.

EINLEITUNG

Die Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen dient als wirkungsvolle Konservierungsmethode, da die meisten pathogenen Bakterien sowie Parasiten und Insekten abgetötet werden. Bisher wurde die Bestrahlung auch als gesundheitlich unbedenklich angesehen. Es wurde jedoch inzwischen nachgewiesen, dass bei der Bestrahlung von fetthaltigen Lebensmitteln eine Gruppe von neuen Substanzen, die 2-Alkylcyclobutanone, bei der Radiolyse von Triglyceriden gebildet werden. Da diese Substanzen bisher nur in fetthaltigen bestrahlten Lebensmitteln gefunden worden sind, werden sie als "unique radiolytic products" betrachtet. Da der Konsument durch die Aufnahme von bestrahltem Fett aus Gerichten oder Gewürzen 2-Alkylcyclobutanone zu sich nimmt, ist es erforderlich eine Sicherheitsbewertung des toxikologischen Potentials dieser Substanzen vorzunehmen.

MATERIAL UND METHODEN.

2-Aminofluoren (Sigma, St Louis, MI, USA) wird mit reinem Ethanol (Carlo Erba, Val de Reuil, France) auf eine Endkonzentration von 5 oder 10mg/ml verdünnt und unter Argon (Air liquide, Strasbourg, France) bei -20°C gelagert. Die verschiedenen 2-Alkylcyclobutanone wurden nach Miesch *et al.* (1999 und 2001) synthetisiert und unter Argon bei -20°C gelagert. Zur Anwendung wurden sie mit Ethanol verdünnt.

Als Wachstumsmedium für Bakterien wurde Nutrient broth N°2 der Firma Oxoid (Dardilly, France) eingesetzt. Ampicillin kam von Boehringer-Mannheim und die *Salmonella typhimurium* Stämme TA97, TA98 und TA100 erhielten wir von Dr B. Ames, University of California, Berkeley, USA.

Die Versuche zur Mutagenese wurden wie früher beschrieben (Miller *et al.*, 1983, Singer *et al.* 1983) durchgeführt. Histidin, Biotin, NADP und Glucose-6-phosphat wurden von Sigma (St Louis, MI, USA) bezogen. TopAgar kam von Difco (Detroit, Mi, USA). Die S9-mikrosomale Fraktion aus Rattenleber erhielten wir von Moltox (Boone, NC, USA).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um biologische Effekte der 2-Alkylcyclobutanone (2-ACB) festzustellen. Zu diesem Zweck verwendeten wir als Testorganismus *Salmonella typhimurium*. Die 2-ACB, i.e. 2-Tetradecyl- (2-tDCB), 2-Dodecyl- (2-dDCB) und 2-Decylcyclobutanon (2-DCB), wurden wie in diesem Bericht beschrieben synthetisiert und ihre Reinheit (GC/MS) auf $> 97\%$ bestimmt. Die aliphatische Kohlenwasserstoffkette, die an Position 2 des 4-Kohlenstoffrings befestigt ist, beeinflusst in hohem Maß die Löslichkeit der 2-ACB in wässrigen Lösungsmitteln. Deshalb wurde als Lösemittel Ethanol eingesetzt. In Ethanol behielten die 2-ACB ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften (M. Miesch, persönliche Mitteilung).

Einfluss der 2-Alkylcyclobutanone auf das Bakterienwachstum

Salmonella typhimurium TA 97 wurde über Nacht angezüchtet auf eine Keimzahl von 10^9 Zellen / ml. Davon wurden verschiedene Aliquote mit 10^7 Zellen / ml Testmedium (Oxoid Nutrient Broth #2) hergestellt, die anschließend mit den verschiedenen 2-ACB, bzw. Ethanol (in einer Endkonzentration von 1 – 2 %) versetzt wurden. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und das Bakterienwachstum in den folgenden 7 Stunden durch Messung der Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

Die Wachstumskurven wurden durch die Konzentration des Lösemittels beeinflusst. In Abb. 43 ist der Unterschied zwischen den Kulturen mit und ohne Ethanol deutlich zu sehen. Bei einer Endkonzentration von 1 % Ethanol wurde das Bakterienwachstum nur geringfügig beeinflusst: erst nach 5 Stunden Inkubationszeit wurde ein Unterschied zu der Kultur ohne Ethanol beobachtet. Dagegen ist bei einer Endkonzentration von 2 % Ethanol bereits eine Wirkung nach 2 Stunden zu beobachten, die zum Schluß eine 2-fache Reduzierung des Bakterienwachstums verursacht.

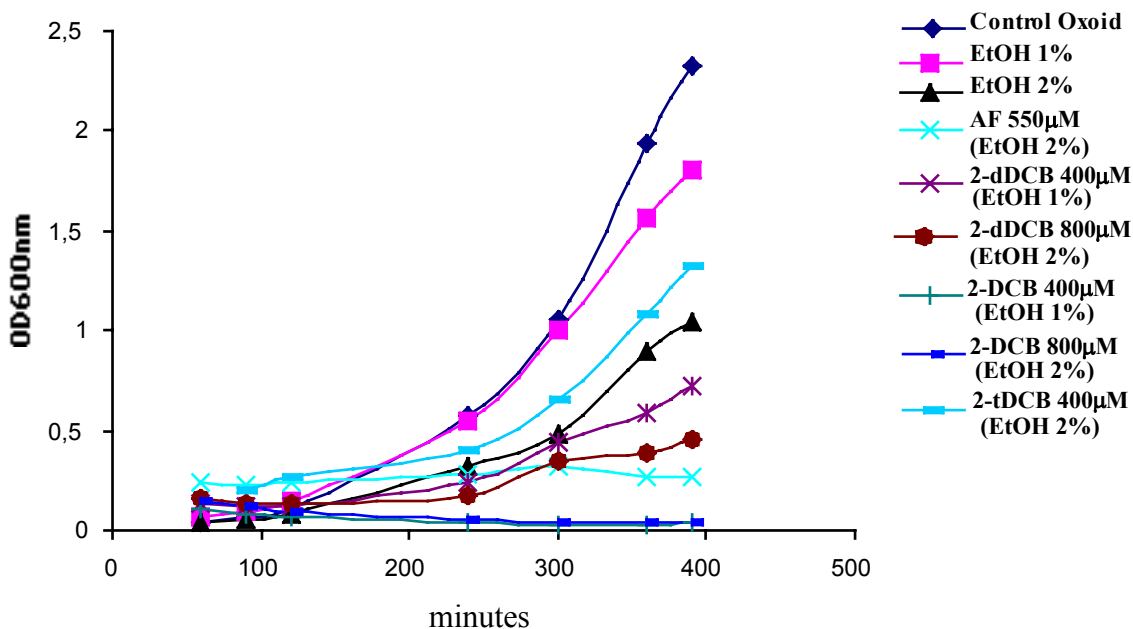


Abb 43: *Wirkung der 2-ACB auf das Bakterienwachstum. Salmonella typhimurium TA 97 wurde bei 37°C in Oxoid Nutrient Broth #2 geschüttelt. Zu den Testansätzen wurden verschiedene Konzentrationen von 2-ACB (mit Ethanol (EtOH) verdünnt, Endkonzentration des EtOH: 1 - 2%) zugesetzt. Die optische Dichte bei 600 nm wurde in regelmäßigen Abständen gemessen. Jede Kurve zeigt Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen.*

Die Wachstumskurve von Bakterien, die in Gegenwart von 2-tDCB (400 µM) kultiviert wurden, unterscheidet sich nicht signifikant von der entsprechenden Kontrolle (2 % EtOH). Dieses Ergebnis zeigt, dass 2-tDCB bei dieser Konzentration keinen Einfluß auf das bakterielle Wachstum hat, bzw. dass dieser Einfluß nur sehr schwach ist und den des Lösemittels nicht übersteigt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche, in denen die Bakterien mit Abkömmlingen des 2-tDCB, nämlich dem 2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB) oder dem γ -Stearolacton, inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigte die Behandlung mit 2-dDCB (400 und 800 µM) eine signifikante Wachstumsreduzierung der TA 97 Testorganismen, die sich in einer Verdoppelung der Generationszeit im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen äußerte

(Tab. 4). Die Wirkung von 2-DCB war noch drastischer, da nach 6 Stunden Inkubation überhaupt kein Wachstum der Bakterien beobachtet wurde; eine Generationszeit konnte daher nicht angegeben werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter unseren Versuchsbedingungen zwei Substanzen, nämlich das 2-dDCB und das 2-DCB, eine deutliche Hemmung des Bakteriumwachstums verursachen. Wenn allerdings länger als 24 Stunden inkubiert wurde, nahm die Wachstumsrate der Bakterien, die mit 2-dDCB oder 2-tDCB behandelt wurden, wieder zu und näherte sich der der Kontrollen an (Daten nicht gezeigt). Die Substanzen haben deshalb entweder zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften. Um diese Unterscheidung zu treffen, sind weitere Versuche durchgeführt worden.

Tabelle 4: Generationszeiten von *S. typhimurium* TA 97 Zellen, die in Medium mit Zusatz von verschiedenen 2-Alkylcyclobutanonen kultiviert wurden.

Kulturen	Generationszeit (Minuten)	Proportionalitätsfaktor im Vergleich mit der entsprechenden Ethanolkontrolle
Kontrolle Oxoid	50	
Kontrolle EtOH 1%	75	
Kontrolle EtOH 2%	100	
2-tDCB (400 µM)	100	1 (EtOH 2 %)
2-dDCB (400 µM)	150	2 (EtOH 1 %)
2-dDCB (800 µM)	235	2-2,5 (EtOH 2 %)
2-DCB (400 µM)	nn	
2-DCB (800 µM)	nn	

nn: nicht nachgewiesen

Einfluss der Konzentration von 2-ACB auf das Bakterienwachstum

In weiteren Versuchen wurden mehrere Konzentrationen von 2-DCB und 2-dDCB getestet (Abb. 44 a, b). Eine Lösung mit 4 µM 2-dDCB (Abb. 44 b) verursachte keine Hemmung des Bakterienwachstums. Dagegen konnte eine Reduzierung des Wachstums bei höheren Konzentrationen (10 - 100-fach) beobachtet werden. Abb. 44 a zeigt, dass eine Konzentration von 4 µM 2-DCB die gleiche Wirkung wie 40 µM 2-dDCB hat. Höhere Konzentrationen von 2-DCB hemmen das Wachstum außerordentlich.

Zum Vergleich wurden die Bakterien unter den gleichen Bedingungen mit 2-Amino-fluoren (2-AF), auch in Ethanol verdünnt, behandelt. Dieses aromatische Amin wird öfters als Modell für ein Procarcinogen eingesetzt. Es wird *in vivo* verstoffwechselt und bildet dann reaktive Intermediärprodukte, die kovalent an die DNA gebunden werden und Mutationen verursachen. Bei *in vivo*-Versuchen zeigt sich die Substanz zytotoxisch und mutagen in Bakterien und induziert Lebertumore in Ratten (Singer *et al.*, 1983, Miller *et al.*, 1983). In unseren Versuchen zeigten die 2-AF-behandelten Zellen eine Wachstumsverzögerung, abhängig von der eingesetzten Konzentration (Abb. 44 a, b).

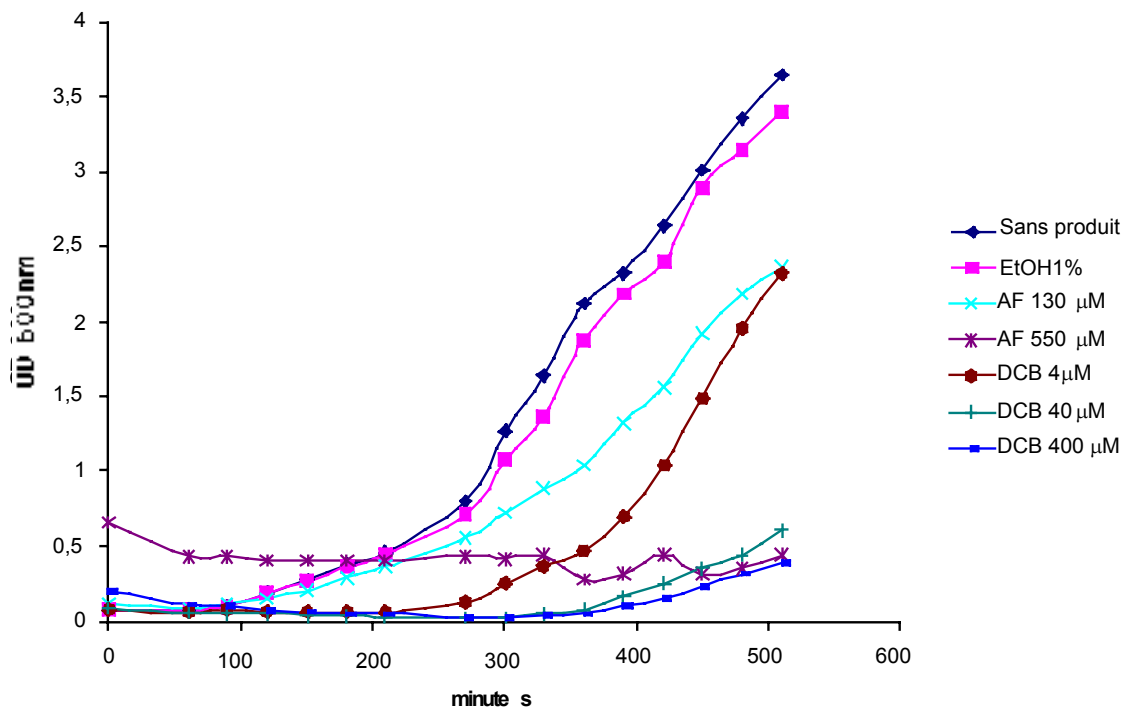


Abb. 44 a: *Einfluss verschiedener Konzentrationen von 2-DCB auf das Wachstum von Salmonella typhimurium TA 97. Alle Testsubstanzen sind in Ethanol gelöst.*

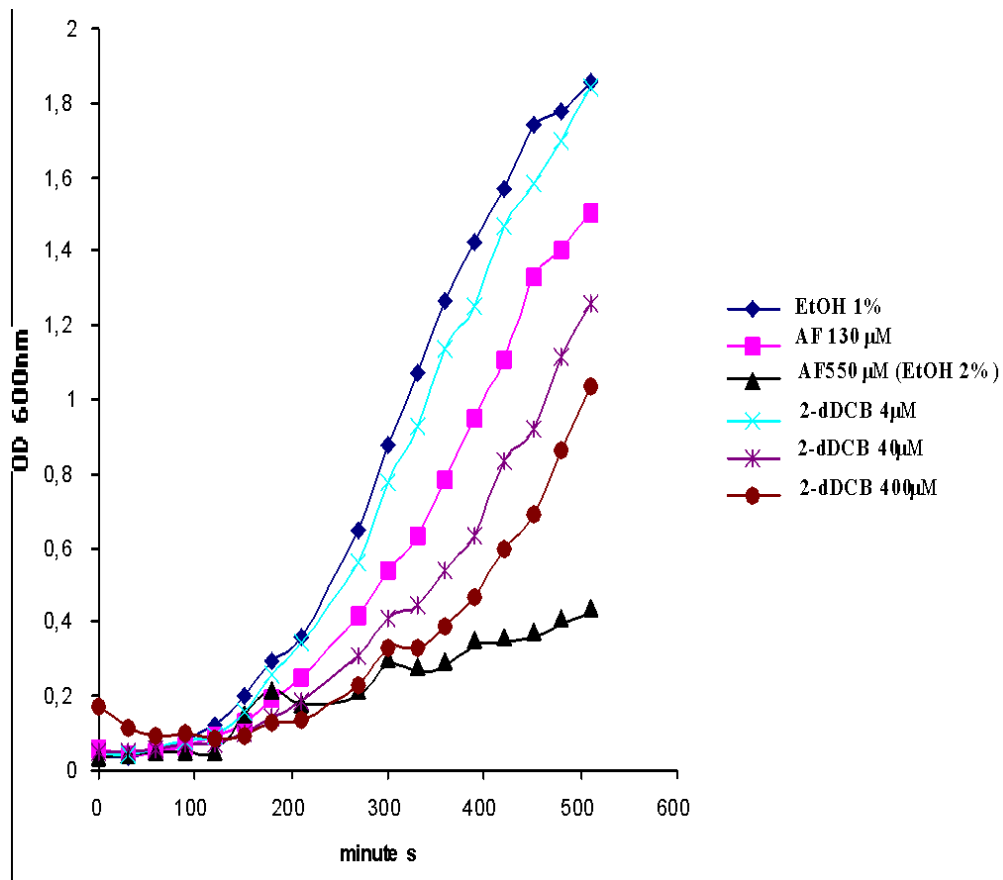


Abb. 44 b: *Einfluss verschiedener Konzentrationen von 2-dDCB auf das Wachstum von Salmonella typhimurium TA 97. Alle Testsubstanzen sind in Ethanol gelöst.*

Beim Vergleich der Testsubstanzen 2-DCB, 2-dDCB und 2-AF und deren eingesetzten Konzentrationen zeigt sich, dass 2-DCB etwa 30 x toxischer ist als 2-AF (Abb. 44 a) und 2-dDCB etwa 5 x toxischer ist als 2-AF (Abb. 44 b).

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass 2-DCB toxischer als 2-dDCB ist. Die relative Toxizität von 2-DCB im Vergleich mit 2-dDCB wird in Abb. 45 bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Wachstumskurven normalisiert. Für jeden Punkt der Kurve wurde der Wert der optischen Dichte mit dem der entsprechenden Kontrolle dividiert, weiterhin wurde das Verhältnis R zwischen 2-dDCB und 2-DCB gebildet. Dieses Verhältnis R wurde als Funktion der Zeit abgebildet (Abb. 45). Die Kurven für 2-AF sind, wie erwartet, ganz flach, da ja die gleiche Testsubstanz die gleiche Wirkung in beiden Experimenten hat. Die Kurven für die beiden 2-Alkylcyclobutanone zeigen für jede Konzentration eine glockenähnliche Form, deren Maximum den größten Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den beiden Kulturen aufzeigt. Aus den 3 Kurven von R kann ein Mittelwert von $R = 10$ gebildet werden. Damit ist der Hemmeffekt von 2-DCB in etwa 10-fach höher als der von 2-dDCB. Dieses Ergebnis wird untermauert im nächsten Versuch, der das Überleben der Bakterien in Gegenwart der 2-Alkylcyclobutanone prüft.

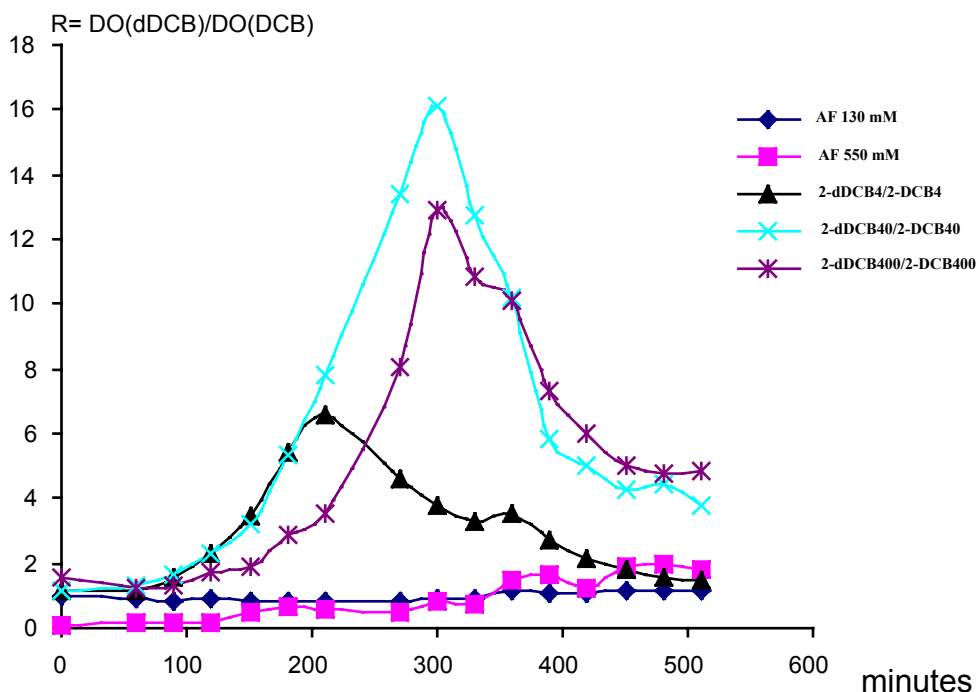


Abb. 45: Die Veränderung des Verhältnisses R mit der Zeit. R ist das Verhältnis der normalisierten Wachstumskurven von *Salmonella typhimurium* TA 97 in Gegenwart von 2-dDCB und 2-DCB.

Überlebenskurven

Da die 2-ACB eine deutliche Wirkung auf das Bakterienwachstum aufwies, sollte herausgefunden werden, ob diese Substanzen zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften besitzen. *Salmonella typhimurium* TA 97 Zellen wurden mit den verschiedenen 2-ACB bei unterschiedlichen Konzentrationen und Zeiträumen inkubiert, Aliquote auf Testmedium aufgebracht und über Nacht bei 20°C inkubiert. Die toxische Wirkung jeder Komponente wurde gemessen als die Anzahl der überlebenden Kolonien im Vergleich zu denen der unbehandelten Kontrolle.

In einem vorläufigen Experiment wurde das Überleben als eine Funktion der Inkubationszeit bestimmt (Abb. 46). In Übereinstimmung mit der vorläufigen Schlußfolgerung aus den Versuchen mit den Wachstumskurven (Abb. 43) zeigte sich, dass 2-tDCB keine toxische

Wirkung besitzt. Dagegen zeigten 2-DCB und 2-dDCB eine zeitabhängige Reduzierung des Wachstums. Hier ist es erwähnenswert, dass 2-DCB behandelte Testorganismen eine etwa 10-fach geringere Koloniebildungsfähigkeit zeigen, als die mit 2-dDCB-behandelten Zellen. Dieses Ergebnis unterstützt unsere frühere Annahme (Abb. 45).

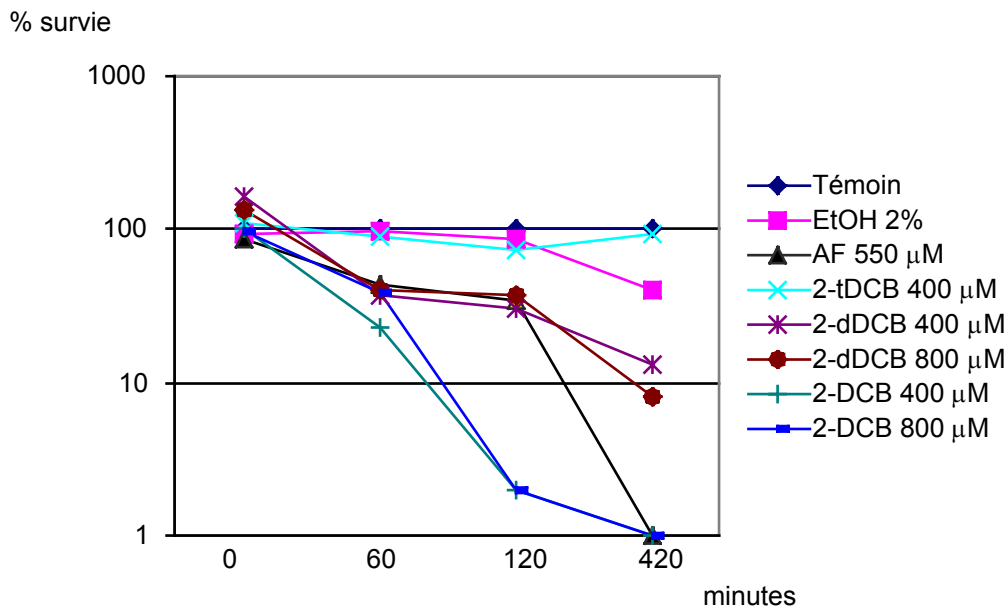


Abb. 46: Überlebenskurven von *Salmonella typhimurium* TA 97 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von 2-ACB und verschiedenen Inkubationszeiten behandelt wurden.

Dieser Versuch erlaubt auch die Bestimmung der niedrigsten Konzentration eines 2-ACB, bei der ein toxischer Effekt beobachtet wird. Nach dem Poisson'schen Gesetz der Wahrscheinlichkeit mit der seltene Ereignisse auftreten, kann die Konzentration, bei der ein lethaler Effekt auftritt, durch die 37 %ige Überlebensfähigkeit bestimmt werden. Wird nun % Überlebensfähigkeit als Funktion der Konzentration der 2-ACB abgebildet (Abb. 47), wird die 37 %ige Überlebensfähigkeit erreicht bei in etwa 4 µM 2-DCB und 40 µM 2-dDCB. Auch hier besteht wieder ein Faktor 10 zwischen der Toxizität von 2-DCB und 2-dDCB. Für 2-tDCB wäre die erforderliche Konzentration über 400 µM, weit mehr, als in Ethanol gelöst werden kann.

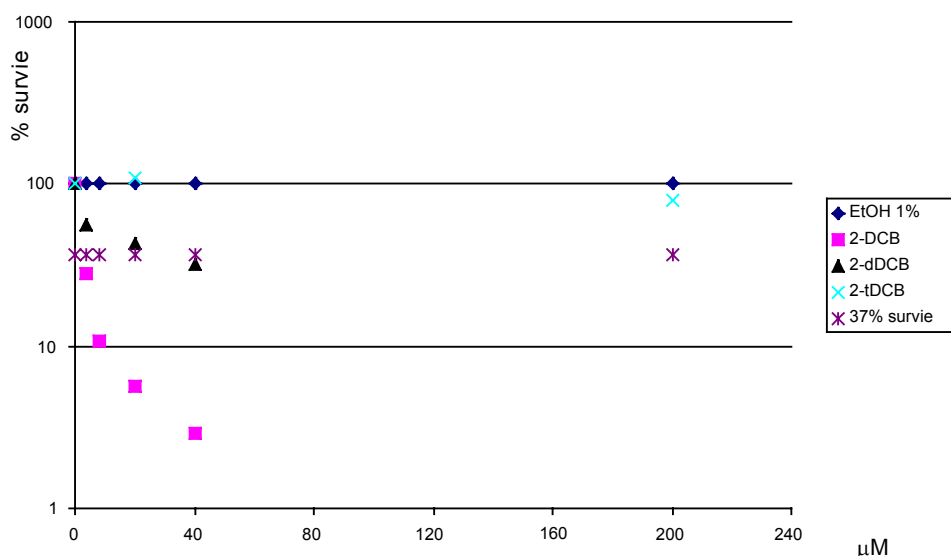


Abb. 47: Bestimmung der 37%igen Überlebensfähigkeit von *Salmonella typhimurium* TA 97, die mit verschiedenen Konzentrationen der 2-ACB behandelt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass einige 2-Alkylcyclobutanone zytotoxische Wirkungen auf die Testorganismen ausüben. Die Höhe dieser Wirkung ist wahrscheinlich mit der Länge der Alkylkette verknüpft.

Versuche zur Mutagenität

Um eine mögliche mutagene Wirkung der 2-ACB in den Testorganismen zu überprüfen, wurde der Ames Test eingesetzt - eine inzwischen klassische Methode zur Identifizierung mutagener Substanzen (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983). Der Ames Test verwendet verschiedene Stämme von *Salmonella typhimurium*, welche Histidin zu ihrem Wachstum benötigen. Diese Mutanten zeigen jeweils eine spezifische Mutation in einem Gen der Histidin-Biosynthese auf, so dass sie Histidin nicht selbst herstellen können, sondern das Histidin dem Nährmedium zugesetzt werden muß. Durch Rückmutation - durch mutagene Agenzien - zum histidin-unabhängigen Wildtyp können die Bakterien auf histidin-freien Minimalböden wieder wachsen. Jeder Stamm zeigt eine spezifische Mutation, die entweder durch Basenpaar-Substitution oder -1 bzw. -2 Rasterschubmutation rückgängig gemacht werden kann. Durch Verwendung der verschiedenen Stämme kann daher eine Aussage über den Mutationstyp getroffen werden und manchmal auch über die Art der prämutagenen Läsion, die durch die Testsubstanz induziert wird.

Als positive Kontrolle wurde das 2-Aminofluoren eingesetzt, weil diese Substanz bereits ausführlich mittels Ames Test untersucht worden ist (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die spontanen Rückmutationsraten der Kontrollversuche sind in Übereinstimmung mit der Literatur (Ames *et al.*, 1975, Maron *et al.*, 1983).

Keines der untersuchten 2-ACB zeigte unter unseren Bedingungen eine Mutagenität, weder in Gegenwart noch in Abwesenheit einer S9-mikrosomalen Fraktion aus der Rattenleber. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer früheren Untersuchung von de Meester und Leonard (1992), in der für 2-dDCB im Ames Test keine Mutagenität festgestellt wurde.

Es scheint, dass die 2-ACB keine direkten Mutagene sind, da in Abwesenheit der S9-Fraktion keine Revertanten gefunden wurden. Es ist jedoch verfrüht, aufgrund dieser Ergebnisse zu der Schlußfolgerung zu kommen, dass diese Substanzen kein mutagenes Potential aufweisen. Möglicherweise enthält die S9-Fraktion nicht die erforderlichen Enzyme für eine metabolische Aktivierung dieser Substanzen oder die mutagene Aktivierung verläuft über einen anderen Weg, z.B. über Oxidation, der in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden kann. In diesem Projekt wurden mit einer anderen Technik oxidative DNA-Schäden durch 2-ACB untersucht. Dieser Nachweis oxidativer DNA-Schäden erfolgte durch den Einsatz der Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg-Protein) und bei einigen 2-ACB wurden tatsächlich oxidative DNA-Schäden beobachtet. Ebenso zeigen die Ergebnisse von Raul *et al.* in diesem Projekt, dass 2-tDCB und 2-tDeCB einen Promotor-Effekt bei der Colon-Carcinogenese aufweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die 2-ACB ein genotoxisches Potential besitzen könnten. Weitere Versuche sind jedoch erforderlich.

Tabelle 5 : *Analyse des mutagenen Potentials der 2-Alkylcyclobutanone im Ames Test.*

Stämme	TA97		TA98		TA100	
Rückmutation	-C		-CG		G→T	
Spontane erwartete Rückmutationen (Kolonien/Test)	90-180		30-50		120-200	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
2-DCB						
0,4 µM	307	321	26	39	204	191
1 µM	314	317	30	32	162	162
2 µM	336	432	28	29	183	174
4 µM	147	262	27	40	161	177
	133	365			177	167
					176	164
40 µM	207	264	32	43	160	212
	133	360			187	174
					188	199
2-dDCB						
4 µM	174	241	37	34	172	152
	133	339			154	183
40 µM	155	203	37	49	160	172
	133	293			171	177
					167	178
2-tDCB						
40 µM	184	218	36	42	158	159
	133	300			207	189
400 µM	172	228	34	32	146	160
	316	277			174	183
					175	184
Ohne Testsubstanz						
	134	188	36	36	167	172
	294	286			143	196
					162	187
2-AF						
55 µM	168	595	33	1824	158	371
	260	826			190	698
550 µM	130	1636	138	5736	184	3476
	342	1654			184	3128
					159	2936

Die Anzahl der Kolonien stellen den Mittelwert aus 3 Bestimmungen dar.

SCHLUSSFOLGERUNG

Diese Untersuchung hat gezeigt, dass einige 2-Alkylcyclobutanone eine zytotoxische Aktivität auf die getesteten *Salmonella typhimurium* Stämme ausüben. Die toxische Dosis für 2-DCB ist in etwa 4 µM (1 µg/ml), für 2-dDCB ist sie 10-fach höher. Die Höhe dieser Wirkung hängt wahrscheinlich mit der Länge der aliphatischen Alkylkette zusammen: 2-DCB zeigt eine 10-fache, bzw. 100-fache höhere Toxizität als 2-dDCB und 2-tDCB, deren aliphatische Seitenketten 2 bzw. 4 zusätzliche Kohlenstoffatome aufweisen. Die molekulare Basis für diese Toxizität ist gegenwärtig noch unbekannt. Obwohl genotoxische Effekte der 2-ACB durch den Comet Assay (Delincée *et al.*, 1998) und durch Bildung von Fpg-sensitiven DNA-Läsionen beobachtet wurden, konnte keine mutagene Aktivität der 2-ACB durch den Ames Test nachgewiesen werden.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau F. Exinger, Herrn Bernard Hezard von Aérial und Herrn Professor Guy Dirheimer für ihre Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Ames, B.N., Cann, J.Mc, Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella/mammalian-microsome* mutagenicity test. *Mutation Research*, **31**, 347-361.

Delincée, H., Pool-Zobel, B.L. (1998) Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. *Radiat. Phys. Chem.*, **52**, 1-6.

Maron, D.M., Ames, B.N. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.

Miesch, M., Ndiaye, B., Hasselmann, C., Marchioni, E. (1999) 2-Alkylcyclobutanones as markers for irradiated foodstuffs. 1. Synthesis of saturated and unsaturated standards. *Radiat. Phys. Chem.*, **55**, 337-344.

Miesch, M., Horvatovich, P., Raul, F., Burnouf, D., Delincée, H., Hartwig, A., Werner, D., Marchioni, E. (2001) Efficient reaction pathway for the synthesis of saturated and monounsaturated 2-alkylcyclobutanones. *Radiat. Phys. Chem.*, in press.

Miller, J.A., Miller, E.C. (1983) Some historical aspects of N-aryl carcinogens and their metabolic activation. *Environ. Health Perspect.*, **49**, 3-12.

Singer, B., Grunberger, D., eds. (1983) *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum press, New York.

2.6.4. Der Einfluss von 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB) und 2-Tetradecenylcyclobutanon (2-tDeCB) auf die Darm-Carcinogenese in Ratten.

Francis Raul

Laboratoire du Contrôle Métabolique et Nutritionnel en Oncologie Digestive
Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Das Ziel unserer Arbeit war es festzustellen, ob 2-tDCB bzw. 2-tDeCB die Entwicklung von Darmkrebs in Ratten, die ein chemisches Carcinogen erhielten, begünstigt.

AUFBAU DES EXPERIMENTS (Abb. 48)

Die Versuche wurden nach den Regeln des Nationalen Forschungsrates für den Umgang mit Labortieren (Erlaß Nr. 00573 des französischen Landwirtschaftsministeriums) durchgeführt.

Männliche Wistar Ratten (n = 36) mit einem Körpergewicht von 260 - 270 g, wurden unter Standardbedingungen (22°C; 60 % relative Luftfeuchtigkeit; 12 h / 12h Licht/Dunkel-Zyklus, 20-facher Luftwechsel / h) gehalten. Die Ratten wurden in 6 Gruppen (6 Ratten pro Gruppe) randomisiert eingeteilt und erhielten *ad libitum* die gleiche isoenergetische Diät (Standard-Laborfutter UAR A04, Villemoisson/Orge, France). Diese unbestrahlte Diät enthielt 16 % Protein als Casein und Fischprotein, 60 % Kohlenhydrate in Form von Weizenstärke, 3 % Fett als Soja- und Fischöl, 6 % Salzmischung und 1 % Vitaminmischung. Die Fettsäurezusammensetzung der Diät betrug: 2,6 mg / g Palmitinsäure, 0,5 mg / g Stearinsäure, 8 mg / g Ölsäure und 14,5 mg / g Linolsäure.

Die 4 Testgruppen erhielten täglich um 17:00 Uhr als Trinkflüssigkeit eine frisch zubereitete wässrige Lösung von entweder 2-tDCB oder 2-tDeCB in einer Konzentration von 0,005 % (w/v) in 1 % Ethanol. Die zwei Kontrollgruppen erhielten 1 % Ethanol. Der Flüssigkeitskonsum wurde täglich registriert und die durchschnittliche Aufnahme von 2-tDCB oder 2-tDeCB war etwa 1 mg pro Ratte pro Tag. Während der Versuchsdauer wurde jede Woche das Körpergewicht gemessen. Nach einer zwei-wöchigen Anfangsphase erhielten alle Ratten einmal in der Woche eine i.p. Injektion von 15 mg / kg Körpergewicht Azoxymethan (AOM) in Woche 3 und 4. AOM ist ein bekanntes Colon-Carcinogen, das selektiv innerhalb von 3 - 5 Wochen nach der Injektion präneoplastische Läsionen ("aberrant crypt foci") verursacht; nach 4 - 6 Monaten entwickeln sich Polypen (auch Adenome), die nach 10 - 12 Monaten zu makroskopisch sichtbaren Tumoren (Adenocarcinomen) auswachsen (Druckrey, 1970; Pereira et al. 1994).

15 Wochen nach Versuchsbeginn (11 Wochen nach der letzten AOM Injektion in Woche 4) wurden die Ratten einer Kontrollgruppe (n=6), einer 2-tDCB Gruppe und einer 2-tDeCB Gruppe (n=6) getötet und auf präneoplastische Läsionen in der Colon-Mucosa untersucht. In den übrigen 3 Versuchsgruppen (1 Kontroll- und 2 Test-Gruppen) wurden die Ratten nach 27 Wochen (23 Wochen nach der letzten AOM Injektion in Woche 4) getötet.

Das Colon wurde entnommen, mit 0,9 % NaCl gewaschen, längsseitig geöffnet und befestigt, in 10 % gepuffertem Formalin fixiert und mit 0,2 % Methylenblau 5 Minuten angefärbt. Nach einem Spülvorgang mit Krebs-Ringer-Lösung wurde die Darm-Mukosa mit Hilfe eines Mikroskops untersucht (40-fache Vergrößerung) und die Zahl und Größe der präneoplastischen Crypt Foci und Tumoren bestimmt (Bird, 1987; Metz et al. 2000).

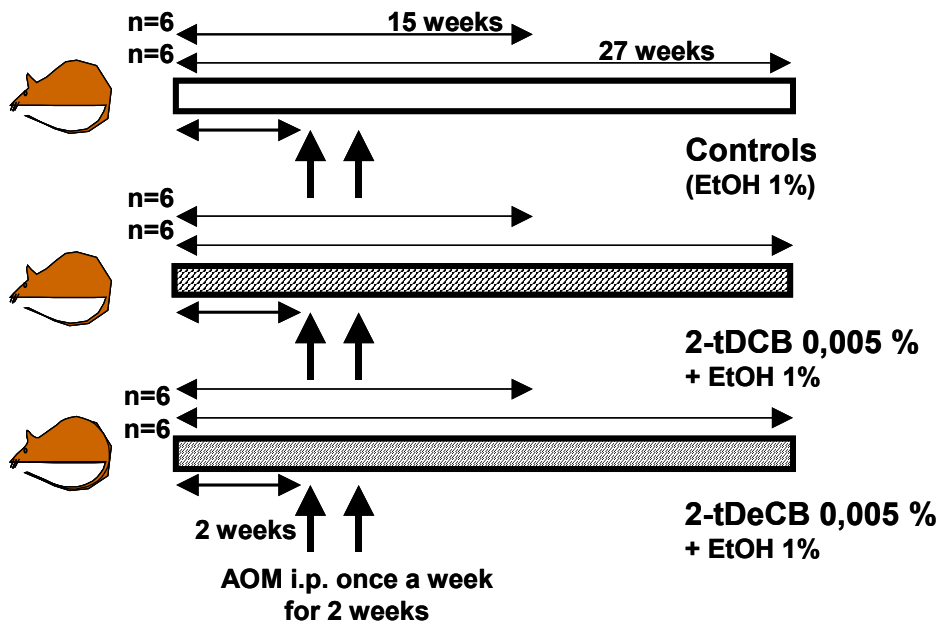


Abb. 48 : Aufbau des Experiments.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wenn 2-tDCB oder 2-tDeCB in einer Konzentration von 0,005 % an Ratten mit der Trinkflüssigkeit verabreicht wurden, zeigten sich während der gesamten Versuchsdauer keine schädlichen Wirkungen auf Wachstum oder Verhalten der Ratten. Das Körpergewicht der Ratten, die die Testsubstanzen verabreicht bekamen, entwickelte sich ähnlich wie in den Kontrollgruppen (Tab. 6).

Tabelle 6 : Entwicklung des Körpergewichtes (in g).

Groups	Initial weight	15 weeks	27 weeks
Controls	261 ± 5	569 ± 14	677 ± 19
+ 2-tDCB	268 ± 5	577 ± 19	680 ± 13
+ 2-tDeCB	270 ± 6	588 ± 20	707 ± 29

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, war auch die Anzahl der präneoplastischen Läsionen (aberrante crypt foci) pro cm Colon ähnlich in der Kontrollgruppe, der 2-tDCB- und 2-tDeCB-Gruppe 11 Wochen nach der AOM Injektion. Auch die Gesamtzahl der aberranten Crypten im gesamten Dickdarm unterschied sich nicht signifikant innerhalb der 3 Gruppen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder 2-tDCB noch 2-tDeCB die Zahl der präneoplastischen Läsionen erhöht, die durch AOM verursacht werden.

Tabelle 7 Präneoplastische Läsionen in der Darm-Mucosa.

Groups	Number of aberrant crypt foci per cm		Total number of aberrant crypts (5 cm colon)	
	15 weeks	27 weeks	15 weeks	27 weeks
Controls	18 ± 2	14 ± 2	253 ± 24	218 ± 39 ^a
+ 2-tDCB	17 ± 3	17 ± 2	221 ± 58	261 ± 42 ^a
+ 2-tDeCB	20 ± 3	19 ± 2	260 ± 32	394 ± 37 ^b

a≠b, p<0,05

Allerdings konnte zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich nach 27 Wochen (23 Wochen nach der letzten AOM Injektion in Woche 4), eine signifikante Zunahme (+ 80 %) in der Gesamtzahl der hyperproliferativen und aberranten Crypten in den Tieren, die 2-tDeCB erhalten hatten, beobachtet werden. In der Gruppe, die 2-tDCB erhalten hatte, war die Gesamtzahl der aberranten Crypten im Vergleich zu den Ratten in der Kontrollgruppe um 20 % erhöht. Auch die Zahl der aberranten Crypt Foci pro cm Dickdarm war in den Ratten, die 2-tDCB oder 2-tDeCB erhalten hatten, leicht erhöht, jedoch war diese Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl der präneoplastischen Läsionen zwischen den Kontrollgruppen und den Gruppen, die 2-tDCB oder 2-tDeCB erhalten hatten, zwar nicht signifikant verschieden war, jedoch die Größe der Läsion im Dickdarm der Ratten, die 2-tDeCB erhalten hatten, deutlich zugenommen hatte.

Abbildung 49 zeigt die Zahl der aberranten Crypten innerhalb eines Focus (crypt multiplicity). Diese Zahl ist von Bedeutung für die neoplastische Ausprägung, da Crypt Foci mit einer größeren Zahl aberranter Crypten wahrscheinlicher einen Tumor ausbilden, während die Foci die nur ein oder zwei aberrante Crypten aufzeigen, sich wieder rückbilden können. Die Ratten, die mit 2-tDeCB behandelt wurden, zeigten 23 Wochen nach der letzten AOM Injektion eine signifikante Zunahme der aberranten Crypten pro Foci. So verursachte 2-tDeCB einen größeren Anteil der Foci mit 4 oder mehr aberranten Crypten. Dieses Ergebnis wurde auch in einem geringeren Ausmaß in den Ratten, die 2-tDCB erhalten hatten, beobachtet.

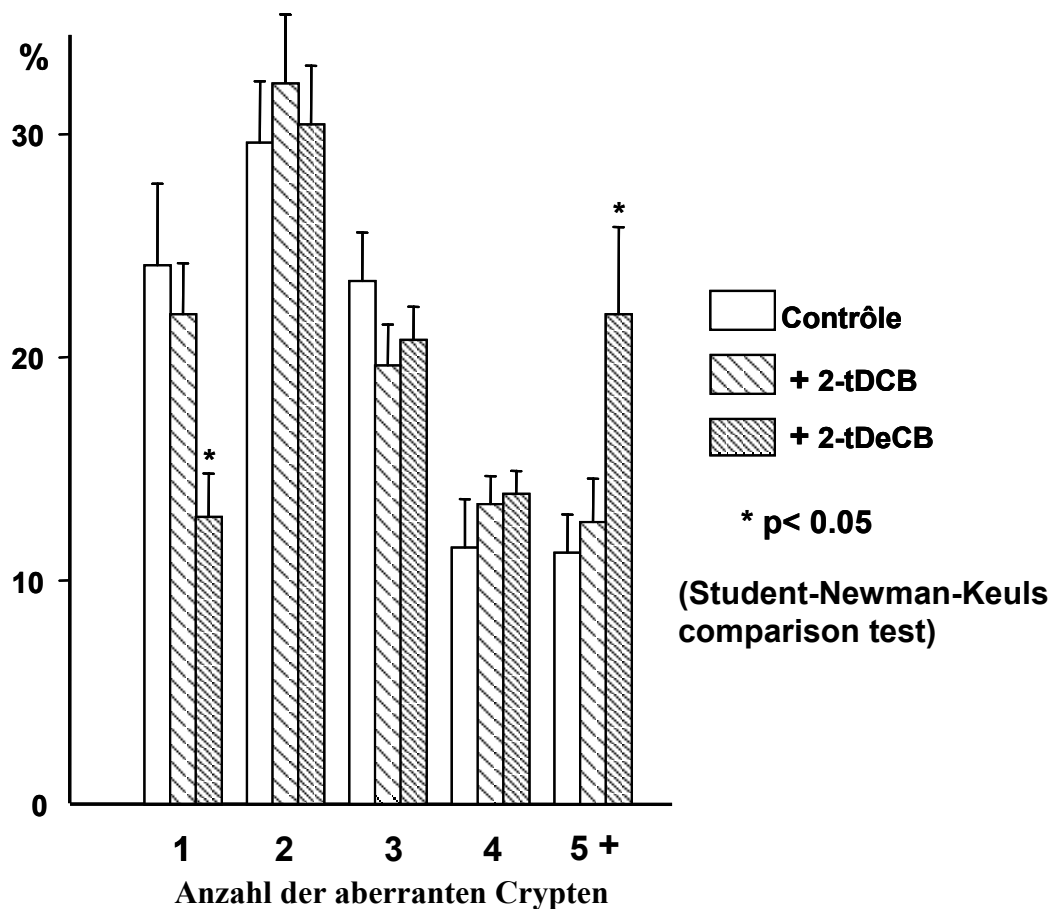


Abb. 49 Anzahl der aberranten Crypten pro Focus im Dickdarm der Ratten, 23 Wochen nach der letzten AOM Injektion.

Abbildung 50 zeigt die erhöhte Zahl der Dickdarmtumoren (Adenoma) in Ratten (23 Wochen nach der letzten AOM Injektion), die entweder 2-tDCB oder 2-tDeCB erhalten hatten, im Vergleich zu den Ratten in der Kontrollgruppe.

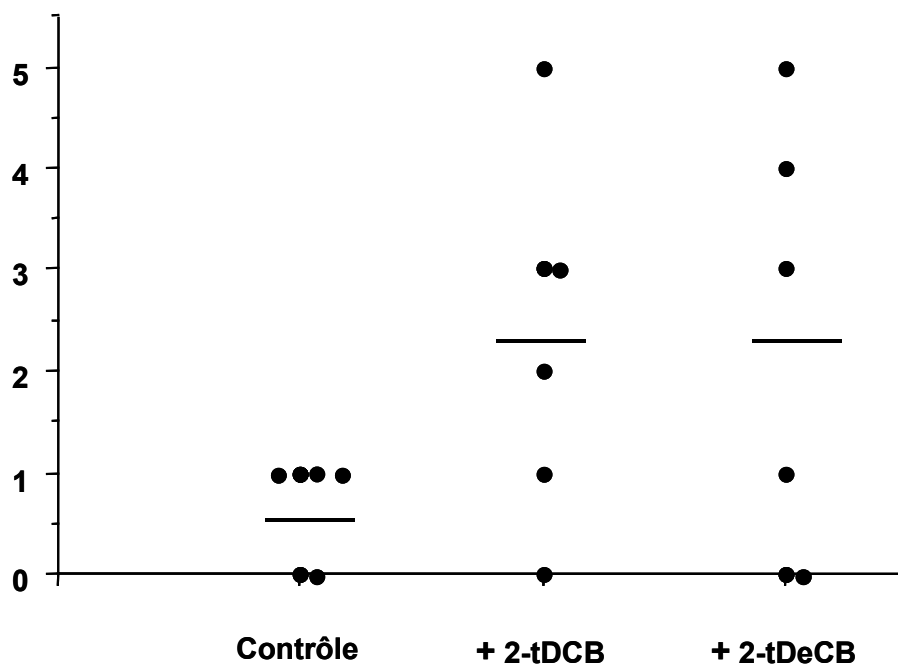


Abb 50 : Gesamtzahl der Dickdarmtumore in AOM-behandelten Ratten.

Die Mittelwerte \pm Standardfehler waren: $0,6 \pm 0,2$ für die Kontrollgruppe, $2,3 \pm 0,7$ für Ratten, die 2-tDCB und $2,2 \pm 0,8$ für Ratten, die 2-tDeCB erhalten hatten.

In der Kontrollgruppe wurden nur bei 4 Ratten ($n = 6$) kleinere Adenome im Dickdarm festgestellt (Tabelle 8). Diese kleineren Adenome waren nicht größer als 6 mm^3 und es wurde nie mehr als 1 Tumor pro Ratte beobachtet. In der Gruppe der Ratten, die 2-tDCB erhalten hatten, wurden bei 5 Ratten Dickdarmtumore gefunden, 4 Ratten zeigten gleichzeitig mehrere Tumore, während 3 Ratten Tumore $> 25 \text{ mm}^3$ aufwiesen. In der 2-tDeCB-Gruppe zeigten 4 von 6 Ratten Dickdarmtumore, bei 3 Tieren wurden gleichzeitig mehrere Tumore gefunden, die entweder eine mittlere Größe (7 to 25 mm^3) aufwiesen und/oder größer als 25 mm^3 waren (Tabelle 8).

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse in diesem Bericht zeigen, dass Ratten, die mit einem spezifischen Colonicarcinogen (AOM) behandelt wurden und zusätzlich entweder 2-tDCB oder 2-tDeCB mit der Trinkflüssigkeit verabreicht bekamen, nach einigen Monaten eine höhere Anzahl größerer Tumore entwickelt hatten, als die nur mit AOM behandelten Kontrolltiere.

Weiterhin zeigten die Ratten, die 2-Alkylcyclobutanone erhalten hatten, eine größere Zahl der aberranten Crypten innerhalb eines Focus (Crypt multiplicity) und mehrfache Tumorbildungen. Die wichtigste Schlußfolgerung ist daher, dass 2-tDCB bzw. 2-tDeCB die neoplastischen Prozesse im Dickdarm von Ratten, die mit einem chemischen Carcinogen behandelt waren, begünstigen.

Tabelle 8 : Größe und Anzahl der Dickdarntumore in AOM-behandelten Ratten.

Ratte	Klein ($< 6 \text{ mm}^3$)	Mittel (zwischen 7 und 25 mm^3)	Groß (mehr als 25 mm^3)
<i>Kontrollen (4/6)</i>			
1	1	0	0
2	1	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	1	0	0
6	1	0	0
<i>2-tDCB (5/6)</i>			
7	1	0	0
8	0	0	0
9	2	1	2
10	0	2	1
11	1	1	1
12	2	0	0
<i>2-tDeCB (4/6)</i>			
13	4	0	1
14	2	1	0
15	1	0	0
16	0	0	0
17	0	2	2
18	0	0	0

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau F. Gossé für ihre Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Bird, R.P. (1987) Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen. Preliminary findings. *Cancer Lett.* **37**, 147-151.

Druckrey, H. (1970) Production of colon carcinoma by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. In *Carcinoma of the Colon and Antecedent Epithelium*, WJ Burdette (ed.), Thomas Publishing, Springfield, IL, pp. 267-279.

Metz, N., Lobstein, A., Schneider, Y., Gossé, F., Schleiffer, R., Anton, R., Raul, F. (2000) Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. *Nutr. Cancer*, **38**, 60-64.

Pereira, M. A., Barnes, L. H., Rassman, V. L., Kelloff, G. V., Steele, V. E. (1994) Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* **15**, 1049-1054.

2.7. NACHWEIS DER 2-ALKYLCYCLOBUTANONE IN FETTGEWEBE UND FAECES VON VERSUCHSTIEREN, DENEN DIESE SUBSTANZEN VERABREICHT WURDEN

Eric Marchioni⁽¹⁾, Péter Horvatovich⁽¹⁾ und Dalal Werner⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment (UMR 7512)

Université Louis Pasteur de Strasbourg

⁽²⁾ CRT Aérial

Gegenwärtig bestehen keine Kenntnisse über das Vorhandensein von 2-Alkylcyclobutanonen in Gewebe von Tieren, die diese Substanzen verzehrt haben. Das Ziel dieser Studie war daher, festzustellen, ob in Fettgewebe von Ratten über die Trinkflüssigkeit verabreichte 2-Alkylcyclobutanone - 2-(Tetradec-5'-enyl)cyclobutanon und 2-Tetradecylcyclobutanon, gebildet durch Bestrahlung von Ölsäure, bzw. Stearinsäure - nachgewiesen werden können.

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien

Verschiedene 2-Alkylcyclobutanone [2-Undecylcyclobutanon (2-uDCB), 2-(Tetradec-5'-enyl)cyclobutanon (2-tDeCB) und 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB)] wurden nach der Methode von Miesch *et al.* (1999) synthetisiert. Kohlendioxid (Reinheit 99,9999 %, 142 bar Helium Headspace) wurde bezogen von Air Product and Chemicals (Allentown, Pennsylvania, USA). *tert*-Butylmethylether (TBME) war von Merck, techn. *n*-Hexan wurde über Calciumhydrid destilliert (Lancaster Synthesis, Morecambe, Großbritannien) und die Reinheit durch Gaschromatographie überprüft.

Silicagel 63 - 200 µm (i.e. 70 - 230 mesh) (Merck) wurde über Nacht bei 100°C erhitzt, abgekühlt und 100 g mit 4 mL ultra-reinem Wasser (Milli Q+, Millipore, Bedford, Massachusetts, USA) deaktiviert. Florisil, mesh 60 - 100 / PR (Aldrich, Saint-Quentin, Frankreich), wurde 5 Stunden auf 550°C erhitzt, abgekühlt und durch Zugabe von 20 mL Wasser zu 100 g Florisil deaktiviert.

Silicagel und Florisil wurden in verschlossenen Flaschen in einem Exsiccator bei Zimmertemperatur höchstens 1 Woche aufbewahrt. Natriumsulfat (SDS Peypin, Frankreich) wurde 5 Stunden auf 650°C erhitzt und anschließend in einem Exsiccator abgekühlt. Hydromatrix (Varian, Palo Alto, California, USA) wurde vor Gebrauch 6 Stunden mit *n*-Hexan unter Rückfluß gewaschen.

Versuchstiere und Diäten

Die Versuche wurden nach den Regeln des Nationalen Forschungsrates für den Umgang mit Labortieren (Erlaß Nr. 00573 des französischen Landwirtschaftsministeriums) durchgeführt. Männliche Wistar Ratten (n=18) mit einem Körpergewicht von 260 - 270 g, wurden unter Standardbedingungen (22°C; 60 % relative Luftfeuchtigkeit; 12 h / 12 h Licht / Dunkel-Zyklus, 20 - facher Luftwechsel / h) gehalten. Die Ratten wurden in 3 Gruppen (6 Ratten pro Gruppe) randomisiert eingeteilt und erhielten *ad libitum* die gleiche isoenergetische Diät (Standard-Laborfutter UAR A04, Villemoisson/Orge, France). Diese unbestrahlte Diät enthielt 16 % Protein als Casein und Fischprotein, 60 % Kohlenhydrate in Form von Weizenstärke, 3 % Fett als Soja- und Fischöl, 6 % Salzmischung und 1 % Vitaminmischung. Die Fettsäure-Zusammensetzung der Diät betrug: 2,6 mg / g Palmitinsäure, 0,5 mg / g Stearinsäure, 8 mg / g Ölsäure und 14,5 mg / g Linolsäure.

Die 2 Testgruppen erhielten täglich um 17:00 Uhr als Trinkflüssigkeit eine frisch zubereitete wässrige Lösung von entweder 2-tDCB oder 2-tDeCB in einer Konzentration von 0,005 % (w/v) in 1 % Ethanol. Die Kontrollgruppe erhielt nur 1 % Ethanol. Der Flüssigkeitskonsum wurde täglich registriert und die durchschnittliche Aufnahme von 2-tDCB oder 2-tDeCB war etwa 1 mg pro Ratte pro Tag. Während der ganzen Versuchsdauer (4 Monate) wurde jede Woche das Körpergewicht gemessen.

Die Faeces von jeder Ratte wurden während der letzten 3 Tage der Versuchsperiode morgens zwischen 8:00 und 8:30 Uhr gesammelt und sofort bei - 80°C eingefroren. Die Proben jeder Ratte wurden zusammengegeben um eine Mindestanalysenmenge von 10 g zu erhalten. Fettgewebe, insbesondere das epididymale und inguinale Fettgewebe wurde von den getöteten Tieren entnommen und bis zur chemischen Analyse bei - 80°C aufbewahrt.

Analyseverfahren

Das Fettgewebe der Ratten (~20 g) und die Faecesproben (~10 g) wurden homogenisiert, mit wasserfreiem Natriumsulfat 50:50 vermischt, in eine Cellulose-Extraktionshülse (Innendurchmesser 33 mm, Länge 100 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland) überführt und 6 Stunden (4 Umläufe/h) mit *n*-Hexan in einer 125 ml Soxhlet Apparatur (Verlabo 2000, Strasbourg, Frankreich) extrahiert. Die Extrakte wurden mit einem Rotationsverdampfer (220 mbar, 30°C) bis zur Trockene eingengt.

Die Hexanextrakte der Faecesproben wurden nach der Fraktionierung mit Florisil-Säulenchromatographie, wie im CEN-Standard EN 1785 (Anonym., 1996b) beschrieben, analysiert. Die Hexanextrakte der Fettgewebeproben wurden durch superkritisches Kohlendioxid gereinigt. 2 g der extrahierten Fette wurden in eine 10 mL Extraktionszelle (rostfreier Stahl, zylindrisch, Innendurchmesser 10 mm, Länge 128 mm) auf etwa ~1 g Hydromatrix aufgebracht. Der Freiraum der Extraktionszelle wurde mit Hydromatrix gefüllt. Der Suprex supercritical extractor, (Typ Prepmaster, Pittsburg, Pennsylvania, USA), war versehen mit einem Accutrap Sammelgefäß, bestehend aus einem automatischen, durchflußkontrollierten, erhitzten Begrenzer, der mit einer 5 mL-Falle (rostfreier Stahl, zylindrisch, Zimmertemperatur, Innendurchmesser 10 mm, Länge 65 mm), verbunden war, die 3 g deaktiviertes Silikagel enthielt (vorher gespült mit 15 ml *n*-Hexan und unmittelbar vor der Extraktion mit einem Stickstoff-Strom (99,995 % Reinheit, Air Liquide, Paris, Frankreich) für 2 Sekunden bei 4 bar getrocknet). Diese Feststoff-Falle war verbunden mit einem Reagenzglas (Flüssigkeitsfalle), das 5 mL *n*-Hexan enthielt. Die Extraktionszelle wurde senkrecht in den Ofen gestellt und mit Kohlendioxid (von unten nach oben) durchströmt (Durchflußgeschwindigkeit 4 ml \cdot min⁻¹, 152 bar, 80°C, 60 min). Das Accutrap Sammelgefäß war mit einer Hochdruckpumpe versehen, die es ermöglichte, bei Zimmertemperatur die Komponenten, die auf der Feststoff-Falle mit Silikagel adsorbiert waren, mit 15 ml *n*-Hexan (2 ml \cdot min⁻¹) zu eluieren. Nach Entfernen der Flüssigkeitsfalle wurde mit 35 mL einer Mischung von *n*-Hexan und TBME (99/1: v/v) eluiert. Die zuletzt eluierten 20 mL wurden gesammelt und unter einem Stickstoff-Strom bei 40°C auf 200 μ l eingengt.

Gaschromatographie

Die Extrakte wurden mittels eines Varian Gaschromatographen (Typ 3400), gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor (Saturn 2000, Varian) mit Elektronenstoßionisation (Emissionsstrom 10 μ A; Modulationsspannung 4,0 V; Verstärkung 20000 Ionen; Temperatur des Traps, Manifolds und Transfers betragen 150°C, 40 °C und 270°C; Spannung des Photomultipliers 1800 V) durchgeführt. Die Massenspektren wurden zwischen 50 und 300 m/z aufgenommen. Der Gaschromatograph war bestückt mit einer OV-20-MS Kapillarsäule (Ohio Valley, Marietta, Ohio, USA), 60 m x 0,25 mm (Innendurchmesser) mit einer 0,10 μ m stationären Phase (20 %

Diphenyl-80 % Dimethylpolysiloxan). Beim SPI gekühlten Injektor war die Anfangstemperatur 50°C, 0,1 min, gefolgt von 230°C / min Heizrate auf 240°C Endtemperatur, die bis zum Schluß des Säulentemperaturprogramms gehalten wurde. Das Ofentemperaturprogramm der Säule war: Anfangstemperatur 60°C, 2 min, Heizrate 8°C / min auf 300°C, Endtemperatur gehalten für 15 min. Injektionsvolumen 1 µl, Trägergas Helium (99,9995 % Reinheit, Air Liquide), 1 ml/min.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Am Ende der 4-monatigen Versuchsdauer war die Zunahme der Körpergewichte bei den Ratten aller 3 Gruppen ähnlich. Die Mittelwerte \pm Standardfehler betragen 569 \pm 14 g in der Kontrollgruppe, 577 \pm 19 g in der 2-tDCB-Gruppe und 588 \pm 21 g in der 2-tDeCB-Gruppe.

2-Alkylcyclobutanone in Fettgewebe von Ratten

Die Chromatogramme der Fettextrakte von Tieren, die 2-tDCB erhielten, zeigten einen Peak, dessen Retentionszeit und Massenspektrum mit denen des 2-tDCB-Standards übereinstimmten (Abb. 51 c). Ebenso zeigten die Chromatogramme der Fettextrakte der 2-tDeCB-Tiere einen Peak, dessen Retentionszeit und Massenspektrum mit denen des 2-tDeCB-Standards übereinstimmten (Abb. 51 b). Die Fettextrakte der Kontrolltiere enthielten keine dieser zwei Substanzen (Abb. 51 a). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die nachgewiesenen 2-Alkylcyclobutanone weder vom Kontrollfutter noch aus anderen Quellen durch Kontamination stammen können. Obwohl die aufgenommenen Mengen von 2-tDCB und 2-tDeCB identisch waren, war der Gehalt des 2-tDeCB in Fettgewebe in etwa 4 mal geringer als der Gehalt des 2-tDCB. Dies deutet darauf hin, dass das mono-ungesättigte 2-Alkylcyclobutanon entweder weniger gespeichert, oder schneller durch die Ratte verstoffwechselt wird.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass 2-Alkylcyclobutanone die Darmbarriere überwinden, in den Blutkreislauf eindringen und im Fettgewebe der Tiere gespeichert werden können. Wenn man davon ausgeht, dass die Ratte eine Körperfettmasse von etwa 30 g aufweist, könnte in Ratten, die täglich eine Menge von etwa 1 mg 2-tDeCB oder 2-tDCB über eine Versuchsdauer von 4 Monaten aufnehmen, die akkumulierte Gesamtmenge an 2-tDeCB oder 2-tDCB auf 2 µg bzw. 9 µg ansteigen. Diese Mengen an 2-Alkylcyclobutanonen im Fettgewebe sind extrem niedrig ($\sim 10^{-5}$ mal der Gesamtmenge, die an 2-tDeCB und 2-tDCB aufgenommen wurden), siehe Tabelle 9. Es kann daraus gefolgert werden, dass diese Substanzen umfassend durch die Ratten verstoffwechselt und - wie später gezeigt wird - auch in Faeces ausgeschieden werden.

Tabelle 9 *Gehalte^a von 2-tDeCB und 2-tDCB in Fettgewebe von Ratten.*

Gruppen	2-tDeCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fett)	2-tDCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fett)
(a) Kontrolle	n.n.	n.n.
(b) 2-tDeCB	0,07 (0,03)	n.n.
(c) 2-tDCB	n.n.	0,31 (0,08)

n.n. : nicht nachgewiesen

^aMittelwert aus drei Bestimmungen (Standardabweichung in Klammern)

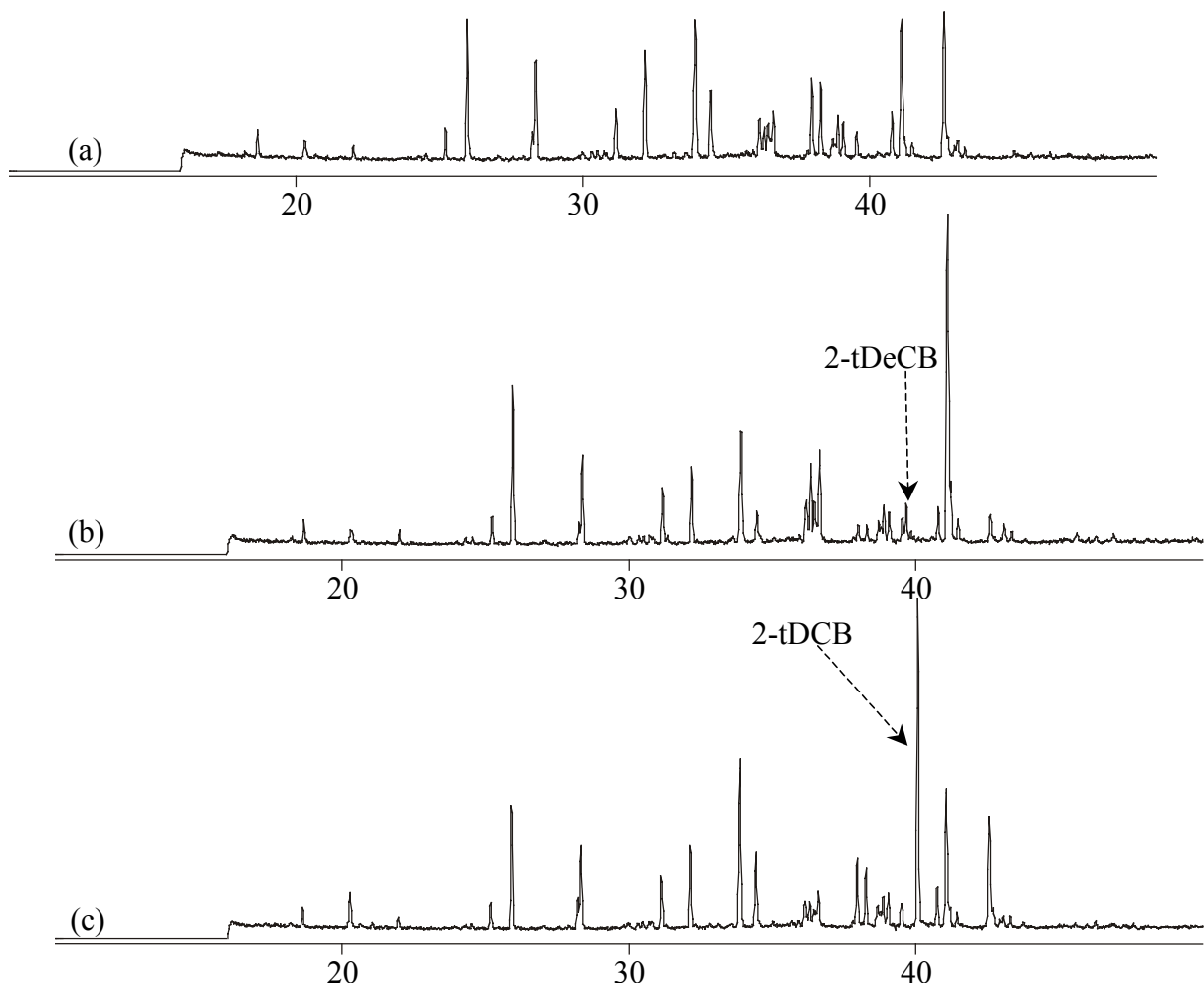


Abb. 51: *Chromatogramme (Detektion der Ionen $m/z=95+98$) der Fettextrakte von Ratten, die in der Trinkflüssigkeit entweder 1% Ethanol (a) oder 2-tDeCB (b) bzw. 2-tDCB (c) mit 1% Ethanol erhielten.*

Analyse der 2-Alkylcyclobutanone in Ratten-Faeces

Aufgrund des geringeren Fettgehaltes der Faeces wurden diese nach der Vorschrift EN 1785 analysiert, da für diese Vorgehensweise nur 200 mg Fett benötigt werden.

Wie bei der Analyse des Fettgewebes zeigten auch die Faecesproben nur die 2-Alkylcyclobutanone, die vom Versuchstier aufgenommen worden sind (Abb. 52).

In den Faecesproben der Kontrolltiere, deren Trinkflüssigkeit aus 1 % Ethanol bestand, konnten keine 2-Alkylcyclobutanone nachgewiesen werden. Dagegen wurden in Faeces der Tiere die 2-tDCB oder 2-tDeCB aufgenommen hatten, genau diese Substanzen nachgewiesen: die chromatographischen Peaks zeigten Retentionszeiten und Massenspektren, die mit denen der entsprechenden Standardsubstanzen identisch waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Teil der 2-Alkylcyclobutanone den ganzen Intestinaltrakt, ohne verändert zu werden, passieren können.

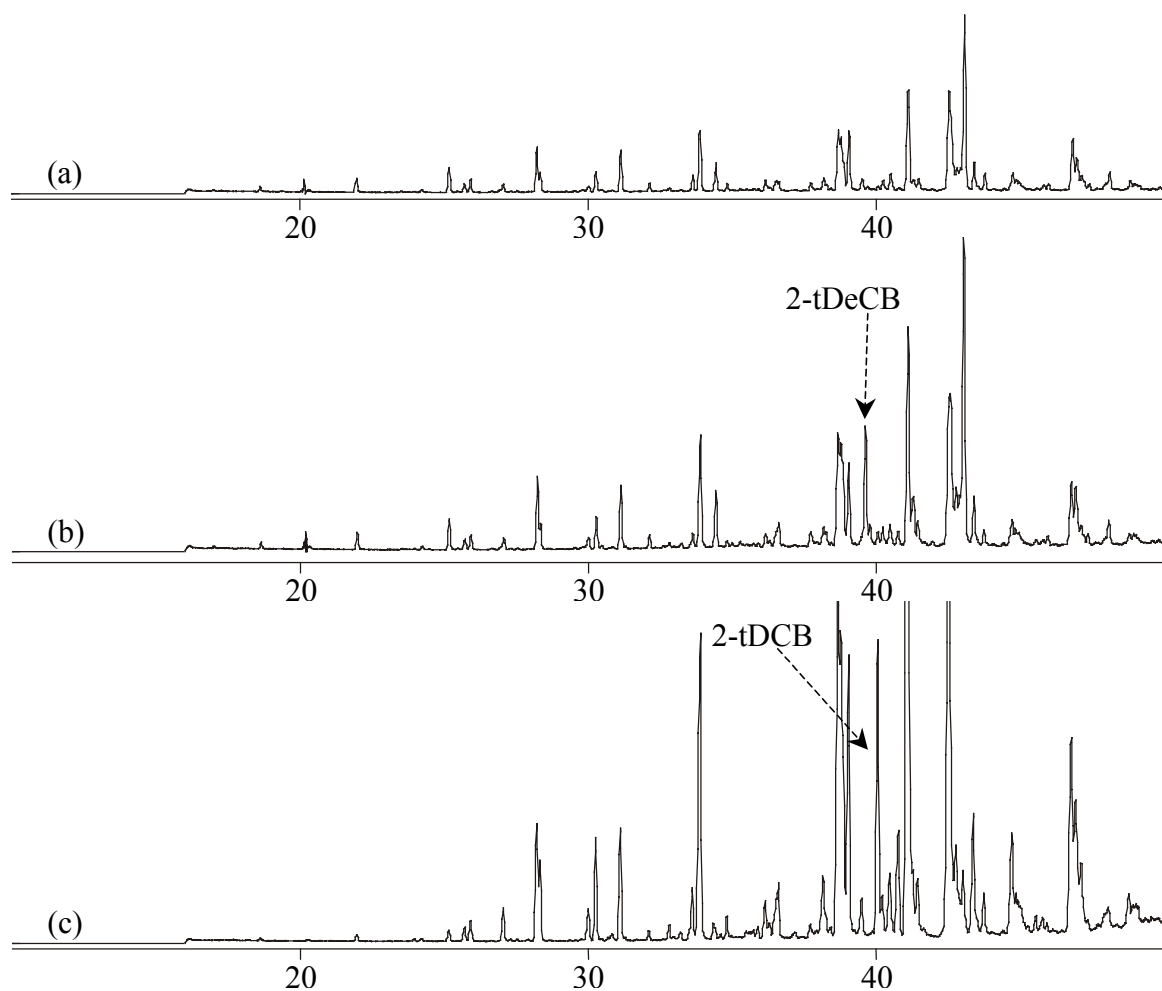


Abb. 52: Chromatogramme (Detektion der Ionen $m/z=95+98$) der Faeces-Extrakte von Ratten, die in der Trinkflüssigkeit entweder 1% Ethanol (a) oder 2-tDeCB (b) bzw. 2-tDCB (c) mit 1% Ethanol erhielten.

Der Gehalt an 2-Alkylcyclobutanonen, der in einer Menge von ~3 g Faeces (Ausscheidung pro Tag) gefunden wurde, betrug in etwa 1,5 μg 2-tDeCB bzw. 3 μg 2-tDCB. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mengen der 2-Alkylcyclobutanone, die täglich in Faeces ausgeschieden werden, in der gleichen Größenordnung sind wie die Mengen, die im Gesamt-Körperfett der Tiere nach 4-monatiger Aufnahme gefunden wurden. Andererseits entspricht die Menge in Faeces nur 0,1 % bzw. 0,3 % der täglich aufgenommenen Menge an 2-Alkylcyclobutanonen. Das bedeutet, dass entweder die größte Menge dieser Substanzen in anderen Teilen des Organismus gespeichert werden, oder dass diese Substanzen schnell verstoffwechselt werden. So haben Elliot *et al.* (1995) darauf hingewiesen, dass 2-Dodecylcyclobutanon, das einem Kaninchen verabreicht wurde, zu einem Lakton (γ -Palmitolacton) umgewandelt wurde. Auch Hamilton *et al.*, (1996) hat die Bildung von γ -Palmitolacton nach mehrmonatiger Lagerung (Kühlschrank) von 2-Dodecylcyclobutanon in Hexanlösung beobachtet. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass eine Oxidation der 2-Alkylcyclobutanone auch im tierischen Organismus stattfindet.

Der Gehalt an 2-tDeCB in Faeces war etwa 2-fach niedriger als der Gehalt von 2-tDCB (Tabelle 10). Dies zeigt, dass die ungesättigte Verbindung leichter abgebaut wird als die entsprechende gesättigte Substanz.

Tabelle 10 Gehalt^a an 2-tDeCB und 2-tDCB in Ratten-Faeces.

Gruppe	2-tDeCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Faeces)	2-tDCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Faeces)
(a) Kontrolle	n.n.	n.n.
(b) 2-tDeCB	0,5 (0,2)	n.n.
(c) 2-tDCB	n.n.	1,0 (0,2)

n.n. : nicht nachgewiesen

^aMittelwert aus 3 Bestimmungen (Standardabweichung in Klammern)

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Zum ersten Mal ist gezeigt worden, dass bei Ratten, die 2-Alkylcyclobutanone aufgenommen hatten, diese Substanzen in Gewebe und Faeces wiedergefunden werden. Bis heute wurden die 2-Alkylcyclobutanone nur in bestrahlten Triglyceriden (LeTellier und Nawar, 1972) oder bestrahlten Lebensmitteln (Stevenson *et al.*, 1990) nachgewiesen. Die Menge der Substanzen in Fettgewebe und Faeces waren jedoch sehr gering im Vergleich mit den großen Mengen an 2-Alkylcyclobutanonen, die von den Ratten aufgenommen worden waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die 2-Alkylcyclobutanone nicht im Ganzen gespeichert, bzw. ausgeschieden werden, sondern möglicherweise in anderen Teilen des Organismus gespeichert oder in großem Umfang verstoffwechselt werden. Weitere Arbeiten sind deshalb erforderlich, um den Stoffwechsel der 2-Alkylcyclobutanone und ihre mögliche pathophysiologische Bedeutung aufzuklären.

DANKSAGUNG

Wir sind allen Kollegen, die in diesem Programm mitgearbeitet haben, zu Dank verpflichtet. Unser besonderer Dank gilt Frau S. Jung für ihre Hilfe und guten Ratschläge.

LITERATUR

Anonym (1996) Foodstuffs. Detection of irradiated food containing fat. Gas chromatographic/Mass spectrometric analysis of 2-alkylcyclobutanones. European Committee for Standardization (Brussels), EN 1785.

Elliot, C.T., Hamilton, L., Stevenson, M.H., McCaughey, W.J., Boyd, D. (1995) Detection of irradiated chicken meat by analysis of lipid extracts for 2-substituted cyclobutanones using an enzyme linked immunosorbent assay. *Analyst*, **120**, 2337-2341.

Hamilton, L., Elliott, C.T., Boyd, D. R., McCaughey, W.J., Stevenson, M.H. (1996) The use of 2-substituted cyclobutanones in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of irradiated foods. In *Detection Methods for Irradiated Foods. Current Status*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 285-292.

LeTellier, P.R., Nawar, W.W. (1972) 2-Alkylcyclobutanones from radiolysis of triglycerides. *Lipids*, **7**, 75-76.

Stevenson, M.H., Crone, A.V.J., Hamilton, J.T.G. (1990) Irradiation detection. *Nature*, **344**, 202-203.

2.8. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Im Rahmen des INTERREG Projektes "**Toxikologische Untersuchung zur Risikobewertung beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln**" sind eine Reihe von wichtigen Ergebnissen erarbeitet worden. Zunächst wurde die Synthese von den hauptsächlich in Lebensmitteln vorkommenden 2-Alkylcyclobutanonen (2-ACB) erfolgreich durchgeführt. Zwei Synthesewege für die Herstellung von gesättigten und einfach-ungesättigten 2-ACB wurden ausgearbeitet. Folgende Substanzen wurden hergestellt: das gesättigte 2-Decylcyclobutanon (2-DCB), 2-Undecylcyclobutanon (2-uDCB), 2-Dodecylcyclobutanon (2-dDCB), 2-Tetradecylcyclobutanon (2-tDCB) und das einfach-ungesättigte 2-(Undec-5'-enyl)-cyclobutanon (2-uDeCB), 2-(Dodec-5'-enyl)-cyclobutanon (2-dDeCB) und 2-(Tetradec-5'-enyl)-cyclobutanon (2-tDeCB). Zusätzlich wurde ein mögliches Oxidationsprodukt von 2-tDCB, nämlich das γ -Stearolacton synthetisiert. Durch ihre chromatographischen und massenspektrometrischen Charakteristika wurde die hohe Reinheit (> 97 %) der Substanzen dokumentiert. Es gelang auch die isomeren *cis*- und *trans*-Formen des einfach-ungesättigten 2-(Tetradec-5'-enyl)-cyclobutanons (2-tDeCB, abgeleitet von Ölsäure) zu trennen und ausreichend zu reinigen, um ihre toxikologischen Eigenschaften zu untersuchen.

Durch quantitative Analyse der 2-ACB in verschiedenen Arten von bestrahlten Lebensmitteln, i.e. Trockenmilch, Haselnüsse, Hähnchenfleisch, Rinderfilet, Gänseleberpastete, Kakaobohnen, Hamburger, Räucherlachs, Froschschenkel, Hühnerklößchen, Lachs, Avocado, flüssiges Vollei, konnte eine lineare Funktion zwischen der 2-ACB-Konzentration im Lebensmittel und der absorbierten Strahlendosis festgestellt werden, auch für Lebensmittel, die mit sehr hohen Strahlendosen behandelt waren. Ebenso wurde festgestellt, dass die Menge und Art (Länge und Beschaffenheit der Alkylkette) der strahlen-induzierten 2-ACB nur von den Vorläufer-Fettsäuren im Lebensmittel abhängt.

Schließlich wurde gezeigt, dass 2-ACB unter bestimmten Versuchsbedingungen cytotoxische und genotoxische Eigenschaften aufweisen. Beim Einsatz von Human-Colontumor-Zell-Linien HT 29 und HT 29 cl 19A als *in vitro*-Modellversuch für die Einwirkung von 2-ACB (2-tDCB, 2-dDCB, 2-tDeCB (*cis* / *trans*-mix), *cis*-2-tDeCB, *trans*-2-tDeCB und γ -Stearolacton) auf Dickdarmzellen wurde nach einer kurzen Inkubationszeit (30 Minuten bei 37°C) weder Genotoxizität (analysiert durch Comet Assay), noch Cytotoxizität festgestellt. Bei längeren Einwirkungszeiten (1-2 Tage) und höheren Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) wirkten die Testsubstanzen cytotoxisch. Weitere Untersuchungen unter anderen Bedingungen, bzw. mit anderen Endpunkten, sind erforderlich. Mit einem anderen *in vitro*-Ansatz wurde die Cytotoxizität und Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 2-ACB in zwei Human-Zell-Linien, nämlich HeLa-Zellen, die oft für DNA-Reparatur Studien eingesetzt werden, sowie HT 29 Human-Colontumor-Zellen, getestet. Als empfindlicher Indikator dienen sowohl DNA-Strangbrüche als auch oxidative DNA-Modifikationen. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Testsubstanzen (2-tDCB, 2-tDeCB, 2-d-DCB, 2-DCB) ab einer Konzentration von 100 μM , in beiden eingesetzten Zell-Linien cytotoxisch wirkten. Auch die Induktion oxidativer DNA-Schäden konnte für alle 2-ACB nachgewiesen werden. Bei 2-tDCB und 2-tDeCB, die sich von der gesättigten Stearinsäure oder von der einfach-ungesättigten Ölsäure ableiten, traten diese DNA-Schäden allerdings erst bei Konzentrationen auf, die schon sehr cytotoxisch waren, so dass die Zellen nicht mehr lebensfähig waren. Anders verhielt es sich dagegen bei 2-dDCB und 2-DCB, die sich von der Palmitinsäure, bzw. der Myristinsäure ableiten: hier traten oxidative DNA-Schäden schon bei nicht-cytotoxischen Konzentrationen auf, so dass diese Ergebnisse für die toxikologische Beurteilung relevanter sind. Gleiches gilt auch für das untersuchte γ -Stearolacton, ein Oxidationsprodukt des 2-tDCB, welches insbesondere in HT 29-, aber auch in HeLa-Zellen, in hohem Ausmaß oxidative DNA-Schäden induzierte.

In *Salmonella typhimurium*-Bakterien zeigten einige 2-ACB (2-tDCB, 2-dDCB, 2-DCB) eine deutlich cytotoxische Wirkung, die mit der Länge der aliphatischen Alkylkette korreliert war: je kürzer die Kette, desto höher die Toxizität. In unseren Versuchen wurde die toxische Dosis für 2-DCB auf 4 μ M bestimmt. Es konnte keine mutagene Aktivität der 2-ACB durch den Ames Test mit den *S. typhimurium* Stämmen TA 97, TA 98 und TA 100 nachgewiesen werden.

In einem Tierversuch mit Ratten, die zusätzlich mit einem spezifischen Colon-Carcinogen behandelt worden waren, zeigten 2-tDCB und 2-tDeCB Promotor-Effekte auf die Entwicklung von Darmtumoren. In diesem Versuch wurde eine höhere Gesamtzahl von aberranten Krypten und eine Entwicklung von mehr und grösseren Tumoren in den Tieren, die 2-ACB in Kombination mit dem Kanzerogen Azoxymethan (AOM) erhalten hatten, gefunden. Eine Auslösung (Initiation) der Krebsentstehung durch die 2-ACB allein wurde jedoch nicht nachgewiesen. Jedoch zeigen sowohl die *in vitro*-Versuche als auch die *in vivo*-Versuche mit Labortieren, dass eine potentielle Toxizität der 2-ACB vorhanden ist. Weitere Versuche in den Fütterungsstudien haben gezeigt, dass ein sehr geringer Teil der 2-ACB im Fettgewebe wiederfinden werden kann, während ein ähnlich geringer Teil in Faeces ausgeschieden wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass die 2-ACB nicht im Ganzen gespeichert, bzw. ausgeschieden werden, sondern möglicherweise in anderen Teilen des Organismus gespeichert oder in großem Umfang verstoffwechselt werden. Weitere Arbeiten sind deshalb unbedingt erforderlich, um den Stoffwechsel der 2-ACB aufzuklären.

Wir warnen vor Mißbrauch der vorgelegten Ergebnisse, um die Lebensmittelbestrahlung zu diskreditieren. Es sollte beachtet werden, dass unsere Versuche nur mit hochgereinigten Testsubstanzen (und nicht mit bestrahlten Lebensmitteln die eine große Menge verschiedener Komponenten enthalten) in Zellsystemen und Labortieren durchgeführt wurden. Wir haben festgestellt, dass hochreine 2-ACB in Zellkulturen, Bakterien und Labortieren toxische Effekte zeigen. Wir haben jedoch nicht untersucht, ob 2-ACB diese toxischen Wirkungen auch beim Verzehr von bestrahlten Lebensmitteln zeigen. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint es deshalb verfrüht, um auf der Basis unserer Ergebnisse eine endgültige Risikobewertung beim Verzehr von bestrahlten fetthaltigen Lebensmitteln vorzunehmen.

Da unsere Daten jedoch auf toxische, genotoxische und sogar tumorfördernde Aktivitäten einiger 2-ACB hinweisen, halten wir es für erforderlich, dass weitere Forschung, einschließlich der Bestätigung unserer Ergebnisse durch andere Labors, durchgeführt wird, um eine Risikobewertung für die menschliche Gesundheit vornehmen zu können. Leider kann dieses potentielle Risiko zur Zeit nicht bestimmt werden, weil dafür die entsprechenden Daten noch unvollständig sind. Um das potentielle Risiko zu charakterisieren, müssen die Gefahrenpunkte identifiziert werden, die genaue Aufnahme der Substanzen, die genaue Dosis-Wirkungsbeziehung und insbesondere die Kinetik und Verstoffwechslung der 2-ACB im lebenden Organismus, weiter untersucht werden. Alle diese Untersuchungen sind erforderlich, um einen Einblick in die Mechanismen der toxischen Effekte zu gewinnen. Es sind noch zahlreiche Fragen zu beantworten, noch viele Versuche durchzuführen, bevor eine qualifizierte Risikobewertung stattfinden kann. Ein Anfang jedoch ist gemacht und wir hoffen, dass wir in naher Zukunft weitere Fragen beantworten können.